



(51) Internationale Patentklassifikation 5 :	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 91/13155
C12N 15/62, A61K 39/00		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 5. September 1991 (05.09.91)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP91/00308

(22) Internationales Anmeldedatum: 19. Februar 1991 (19.02.91)

(30) Prioritätsdaten: P 40 05 874.3 24. Februar 1990 (24.02.90) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE]; Sandhoferstr. 116, D-6800 Mannheim 31 (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LUBITZ, Werner [AT/DE]; Fürstenstr. 17, D-8000 München 2 (DE). SZOSTAK, Michael, P. [DE/DE]; Karl-Theodor-Str. 31, D-8000 München 40 (DE).

(74) Anwälte: FOUQUET, Herbert usw. ; Boehringer Mannheim GmbH, Sandhoferstr. 116, D-6800 Mannheim 31 (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), AU, BE (europäisches Patent), CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), DK (europäisches Patent), ES (europäisches Patent), FI, FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), GR (europäisches Patent), HU, IT (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), SU, US.

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

(54) Title: CARRIER-BOUND RECOMBINANT PROTEIN, PROCESS FOR PRODUCING IT AND ITS USE AS AN IMMUNOGEN AND VACCINE

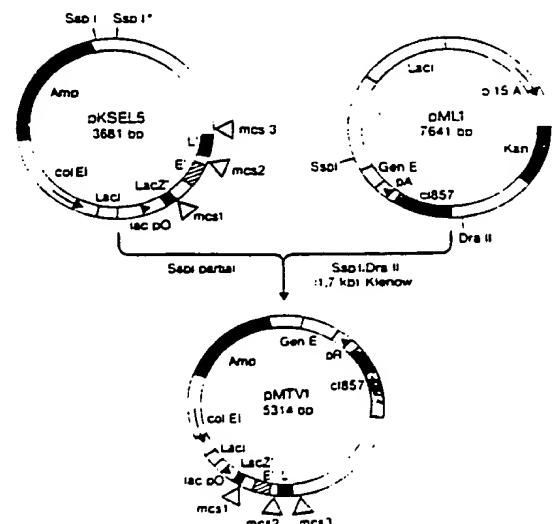
(54) Bezeichnung: TRÄGERGEBUNDENE REKOMBINANTE PROTEINE, VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG UND VERWENDUNG ALS IMMUNOGENE UND VAKZINE

(57) Abstract

A carrier-bound recombinant protein is obtained by expression of a fusion protein gene in Gram negative bacteria that codes for at least a hydrophobic, non-lytic membrane integrating protein domain and for the recombinant protein, and by expressing a gene that codes for a lytic membrane protein from bacteriophages or for a lytic toxin release gene or lytic partial sequence thereof, the carrier-bound recombinant protein being recovered from the culture medium. The recombinant protein is fixedly incorporated in the cell wall complex of Gram negative bacteria by means of a target sequence. Also disclosed are a recombinant DNA used to produce the protein, the process for producing the same and the use of the disclosed carrier-bound recombinant protein for immunisation and as a vaccine.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein trägergebundenes, rekombinantes Protein, erhältlich durch Expression eines Fusionsprotein-Gens in gramnegativen Bakterien, welches für mindestens eine hydrophobe, nicht lytisch wirkende membranintegrierende Proteindomäne sowie das rekombinante Protein kodiert und eines Gens das für ein lytisch wirkendes Membranprotein aus Bakteriophagen oder für ein lytisch wirkendes Toxinreleasegen oder lytisch wirkender Teilesequenzen davon kodiert und Gewinnung des trägergebundenen rekombinanten Proteins aus der Kulturbrühe. Das rekombinante Protein wird dabei über eine Targetsequenz fest in den Zellwandkomplex von gramnegativen Bakterien eingebaut. Ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist eine rekombinante DNA zur Herstellung des Proteins, das Herstellungsverfahren sowie die Verwendung der erfindungsgemäßen trägergebundenen rekombinanten Proteine zur Immunisierung und als Vakzine.



Trägergebundene rekombinante Proteine, Verfahren zur Herstellung und Verwendung als Immunogene und Vakzine

Die Erfindung betrifftträgergebundene rekombinante Proteine, ein Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung, insbesondere als Immunogene und Vakzine.

Die Hauptaufgabe des Immunsystems bei Mensch und Tier besteht in der Abwehr und Vermeidung pathologischer Schäden, die aufgrund von entarteten Zellen infektiösen Viren, Bakterien, Pilzen oder Protozoen entstehen. Das Immunsystem zeichnet sich dadurch aus, daß eine immer stärker werdende Resistenz nach wiederholten Infekten mit Krankheitserregern auftritt. Ziel der Immunisierung ist es, Abwehrkräfte des Immunsystems gegen bestimmte Krankheitserreger aufzubauen, ohne entsprechende Krankheiten auszulösen.

Antikörper und zelluläre T- und B-Lymphozyten, sorgen für die spezifische Abwehr von Erregern. Dabei ist die Erkennung fremder Strukturen wie z. B. solcher, die auf einer Bakterienzelle vorkommen, eine wesentliche Voraussetzung. Je nach Stimulierung des Immunsystems kann dabei nach Immunisierung eine zeitlich begrenzte oder eine lebenslange Immunität gegen Krankheitserreger aufgebaut werden.

Für die Qualität von monoklonalen und polyklonalen Antikörpern sowie für die Wirksamkeit von Vakzinen ist es wesentlich, daß die Immunantwort auf das Antigen in ausreichendem Umfang erfolgt. Häufig zeigen jedoch virale Antigene oder rekombinante humane Proteine, wenn sie ohne weitere Modifikation eingesetzt werden, eine schlechte oder gar keine Immunantwort. Aus diesem Grund werden diese Antigene häufig an Träger (vorzugsweise an Proteine) gekoppelt um die Immunantwort zu verstärken. Durch die Bindung der Antigene an den Träger können jedoch die Antigene im oder in der Nähe der antigenen Determinante verändert werden. Dadurch kann die Immunantwort beträchtlich geschwächt werden.

Zur Verbesserung der Immunantwort ist es vorteilhaft, solche Antigene in die äußere Membran von Bakterien einzubauen und diese Komplexe als Immunogene zu verwenden (J. Immunol. 139 (1987) 1658 - 1664, Bacterial Vaccines and Local Immunity - Ann. Sclavor 1986, n.1-2, pp. 19-22, Proceedings of Sclavo International Conference, Siena, Italy, 17-19 November 1986). Auch werden abgeschwächte bzw. abgetötete Erreger (Bakterien oder Viren), aufbereitete Teilkomponenten von Krankheitserregern (Membranproteine von Bakterien, Strukturproteine von Viren) oder rekombinante Lebendvakzine (Viren oder Bakterien) eingesetzt.

Ein Nachteil bei der Verwendung von lebenden Bakterien oder Viren als Immunogene für die Immunisierung liegt darin, daß eine unerwünschte krankheitserregende Ausbreitung der Keime nicht ausgeschlossen werden kann.

Durch Abtötung oder Fragmentierung der Bakterien und Viren vor Verwendung als Immunogen oder Vakzine kann allerdings die antigenen Determinante verändert

werden, wodurch die Immunantwort deutlich geringer sein kann.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es deshalb, Immunogene und Vakzine bereitzustellen, die diese Nachteile nicht besitzen.

Diese Aufgabe wird durch ein trägergebundenes, rekombinantes Protein gelöst, welches erhältlich ist durch Expression eines Fusionsprotein-Gens in gramnegativen Bakterien, welches für mindestens eine hydrophobe, nicht lytisch wirkende, membranintegrierende Proteindomäne sowie für das rekombinante Protein kodiert und eines Gens, das für ein lytisch wirkendes Membranprotein aus Bacteriophagen, für ein lytisch wirkendes Toxinrelease Gen oder für lytische Teilsequenzen davon (im folgenden als Lyse-Gen bezeichnet) kodiert und Gewinnung des trägergebundenen, rekombinanten Proteins aus der Kulturbrühe.

Vorzugsweise wird die Expression des Fusionsprotein-Gens und des Lyse-Gens von zwei verschiedenen Promotoren (Fig.1) aus gesteuert. Die Expression des Lyse-Gens erfolgt vorzugsweise verzögert gegenüber der Expression des Fusionsproteins.

Durch diese Art der Expression von Fusionsprotein-Gen und Lyse-Gen wird erreicht, daß zunächst eine Vielzahl von Fusionsproteinen in die Membran der als Wirtsorganismus verwendeten gramnegativen Bakterien integriert werden und anschließend eine Lyse dieser Bakterien erfolgt. Der sonst dichte Zellwandkomplex der Bakterien wird dabei so permeabilisiert, daß die cytoplasmatischen Bestandteile der Bakterien freigesetzt werden. (Eur. J. Biochem. 180 (1989), 393 - 398). Die Morphologie der Zellen, beispielsweise die Stäbchenform

von E.coli Zellen, bleibt erhalten. Es bildet sich lediglich in einem abgegrenzten Bereich der Membran eine Tunnelstruktur aus. Die Tunnelbildung wird begleitet durch eine Fusion der inneren und äußeren Membran am Tunnelrand. Die auf diese Weise entstandenen Bakterienhüllen stellen die Träger für das rekombinante Protein dar und werden im weiteren als Bakterienghosts bezeichnet (Fig. 2).

Die Bakterienghosts bestehen aus cytoplasmatischer (innerer) Membran, periplasmatischem Raum und äußerer Membran, wobei die Integrität des Zellwandkomplexes weitgehend erhalten bleibt. Für Bakterienstämme, die zusätzlich eine S-Layer-Schicht (parakristalline Proteinschicht außerhalb der äußeren Membran) aufweisen, ist diese Proteinschicht ebenfalls Bestandteil der Bakterienghosts (Ann. Rev. Microbiol. 37 (1983), 311-339). Die Bakterienghosts sind somit Träger der rekombinanten Proteine (Immunogene) und stellen gleichzeitig aufgrund ihres Aufbaus (Peptidoglykan, Lipopolysaccharid) das Adjuvans zur Verstärkung der Immunantwort dar.

Als Wirtsorganismen sind alle gramnegativen Bakterien, vorzugsweise gramnegative Krankheitserreger wie z.B. *Escherichia coli*, *Bordetella pertussis*, *Campylobacter* *nijuni*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Legionella pneumophilia*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella dysenteriae*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterolitica* geeignet (Schaechter, M, H. Medoff, D. Schlesinger, Mechanisms of Microbial Disease. Williams and Wilkins, Baltimore (1989)).

Die erfindungsgemäßenträgergebundenen, rekombinanten Proteine eignen sich überraschend gut als Immunogene,

wobei es zu ausgeprägten Immunantworten und sehr hohen Antikörper-Titern kommt.

Ein besonderer Vorteil ergibt sich dadurch, daß das rekombinante Protein direkt nach der Expression in die Membran der Bakterien integriert und so die Trägerbindung hergestellt wird. Damit erübrigt sich die Isolierung des rekombinanten Proteins als solches vor Herstellung des Immunogens. Da es zudem für die Herstellung von immunogenhaltigen Bakterienghosts ausreichend ist, wenn einige hundert bis zur maximal möglichen Anzahl (ca. 50000) rekombinante Antigene in die Membran der Bakterienghosts integriert sind, erübrigt sich eine Überexpression des rekombinanten Proteins.

Ein weiterer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht darin, daß sehr viele antigene Epitope im Zellwandkomplex der Bakterienghosts präsentiert werden. Es hat sich gezeigt, daß die Targetsequenzen für die rekombinanten Proteine bestimmte Bereiche innerhalb des Bakterienzellwandkomplexes zur Integration bevorzugen. Diese Bereiche stellen hauptsächlich Adhäsionsstellen der inneren und äußeren Membran dar und stehen mit der Zellteilung der Bakterien in Verbindung. Dadurch kommt es zu keiner uniformen Verteilung des rekombinanten Proteins sondern zu inselartigen Anreicherungen innerhalb des Zellwandkomplexes (vgl. Fig. 2d). Die gehäufte Anordnung der rekombinanten Proteine innerhalb eines relativ kleinen Bereichs (cluster) hat den Vorteil, daß Immunglobulin-tragende B-Zellen zur Proliferation angeregt werden. Zum anderen wirkt das in den Bakterienhüllen vorhandene Lipopolysaccharid als Mitogen und löst ebenfalls ein Signal zur Zellteilung aus. Damit erhält man eine effektive Stimulation der B-Zell-spezifischen Produktion von Immunglobulinen.

Weiter hat sich gezeigt, daß die erfindungsgemäßen trägergebundenen, rekombinanten Proteine in ihren natürlichen Proteinstrukturen und damit in aktiver Form in die Bakterienmembran integriert sind.

Dies ist besonders überraschend, da üblicherweise rekombinante Proteine nach Expression in Prokaryonten als inclusion bodies (vgl. EP-A 0219 874, WO 89/03711) in inaktiver Form erhalten werden und erst anschließend durch Denaturierung und Renaturierung in die aktive Form übergeführt werden können.

Als rekombinante Proteine geeignet sind alle dem Fachmann geläufigen Proteine. Besonders bevorzugt werden Humanproteine und Antigene, insbesondere virale Antigene verwendet. Ihre Größe ist nicht begrenzt. Vorzugsweise beträgt das Molekulargewicht der Antigene aber 2000 bis 200000 Dalton.

Besonders bevorzugt weist das rekombinante Antigen antigene Strukturen von humanen Viren und Retroviren wie z.B. von HIV, HBV und EBV auf.

Die hydrophoben, nicht lytisch wirkenden und membranintegrierenden Proteindomänen werden im weiteren als Targetsequenzen bezeichnet. Bevorzugt sind als Targetsequenzen komplette Sequenzen oder Teilsequenzen von Membranproteinen, die jedoch auch durch Aminosäureaustausche modifiziert sein können. Ein solcher Austausch darf jedoch die Struktur des entsprechenden Proteins nicht verändern.

Vorzugsweise werden solche Targetsequenzen verwendet, die - im Unterschied zu Signalsequenzen von anderen Membranproteinen- durch in der Membran vorkommende Proteasen (z. B. Signalpeptidase und Proteasen des periplasmatischen Raums) nicht gespalten werden. Targetsequenzen können beispielsweise durch Proteinengineering aus natürlich vorkommenden Sequenzen des Lysisgens der Phix174 Phagengruppe (für N-terminales Targeting) sowie aus den natürlich vorkommenden Sequenzen des Lysisgens der MS2 Phagengruppe (für C-terminales Targeting) abgeleitet werden.

Als Targetsequenz eignet sich vorzugsweise eine hydrophobe alpha-helicale Proteindomäne aus 14 bis 20 Aminosäuren, die N- und C- terminal von jeweils 2 bis 30 beliebigen Aminosäuren flankiert sein kann. Vorzugsweise kann an diese Proteindomäne mindestens eine weitere Proteindomäne gebunden sein. Die Bindung erfolgt vorzugsweise über flexible Linkersequenzen. Unter flexiblen Linkersequenzen sind hydrophile Aminosäuresequenzen mit 2 bis 100 Aminosäuren, vorzugsweise mit 2 bis 30 Aminosäuren, und mit ungeordneter Sekundärstruktur zu verstehen (Turn- und Random Coil-Sequenzen).

Die weiteren Proteindomänen, die an die erste Proteindomäne gekoppelt sind, können analog wie die erste Proteindomäne aufgebaut sein. Es ist jedoch bevorzugt, daß mindestens eine der weiteren Domänen eine β -Faltblattstruktur besitzt und aus 10 bis 16 Aminosäuren, vorzugsweise 11 bis 13 Aminosäuren, aufgebaut ist. Solche β -Faltblattstrukturen gleichen vorzugsweise in ihrem Aufbau und ihrer Sekundärstruktur amipathischen Proteinsequenzen, die in Porinen der

äußereren Membranen vorkommen. Für ein N-terminales Targeting ist es bevorzugt, solche Targetsequenzen zu verwenden, welche die Aminosäuren 1 bis 54 von Protein E aus dem Phagen PhiX174 enthalten (im weiteren als E'-Sequenz bezeichnet) und nicht lytisch wirken. Für ein C-terminales Targeting ist es bevorzugt, Targetsequenzen zu verwenden, welche die Aminosäuren 21 bis 75 von Protein L aus dem Phagen MS2 enthalten (im weiteren als L'-Sequenz bezeichnet) und nicht lytisch wirken. (Sequenzen vergleiche EP-A 0 291 021). Ebenso geeignet sind Sequenzen, die sich aus den genannten Sequenzen der E- und L-Targetsequenzen durch einen homologen Aminosäureaustausch, der keine Veränderung der Proteinsekundärstruktur verursacht, ableiten.

Unter Membranproteinen von Bacteriophagen sind vorzugsweise Membranproteine von Bacteriophagen der Klasse Mikroviridae, vorzugsweise von icosahedralen, lytischen und ssDNA enthaltenden Phagen, die Enterobacteriaceae infizieren können, zu verstehen. Beispiele hierfür sind die Phagen PhiX174, S13, G4, G6, G14, PhiA, PhiB, PhiC, PhiR, welche E. coli C Stämme infizieren können. Ebenso geeignet ist alpha3, welcher E. coli C und E. coli B Stämme infizieren kann. Ebenso geeignet sind die Phagen K9, St-1, PhiK, PhiXtB und U3, welche E. coli K12 Stämme infizieren können (Sinsheimer R.L. (1968) in: Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol (Davidson J.N. & Cohn W.W., eds) Vol.8, Academic Press, New York & London, pp. 115-169; Tessman E.S. & Tessmann I. (1978) in: The single-stranded DNA Phages (Denhardt D.T., Dressler D. & Ray D.S., eds.) Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, pp. 9-29; Hayashi M., Aoyama A., Richardson D.L. & Hayashi M.N. (1987) in: The Bacteriophages, pp. 1-71).

Als lytisch wirksame Membranproteine sind vorzugsweise Lyseproteine aus den genannten Bakteriophagen sowie andere Toxin-release Gene wie Colicin Lysegen (Microbiol. Sciences 1 (1984) 168-175 und 203 -205) geeignet.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist an das rekombinante Protein ein nicht kovalent bindender Bindungspartner für dieses Protein, an den gegebenenfalls noch weitere Substanzen kovalent oder nicht kovalent gebunden sind, gebunden. Beispiele für Bindungspaare, deren Partner als Bindungspartner geeignet sind, sind beispielsweise Biotin - Streptavidin bzw. Avidin, Hapten - Antikörper, Antigen - Antikörper, Konkavalin - Antikörper, Zucker - Lectin, Hapten - Bindeprotein (z.B. Thyroxin bindendes Globulin und Thyroxin) oder Oligopeptid-Antikörper.

Bevorzugt wird als bindendes Paar Streptavidin bzw. Avidin und Biotin eingesetzt. Besonders bevorzugt wird als immobilisiertes, rekombinantes Protein Streptavidin bzw. Avidin verwendet und daran biotinyliertes Antigen gebunden.

Weiter ist es bevorzugt als rekombinantes Protein ein Protein zu verwenden, das einen chemischen Liganden erkennt. Beispiele hierfür sind β -Galactosidase/p-Aminophenyl- β -D-thiogalactosid (ein Struktur analoges der Lactose), Gene 29 (1984) 27-31. Durch die Erkennung des aktiven Zentrums der β -Galactosidase ohne eine Spaltung des Substrats, werden derartig substituierte Produkte an die Bakterienghost gebunden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine rekombinante DNA, die eine erste DNA-Sequenz (DNA-Targetsequenz), welche für mindestens eine hydrophobe, nicht lytisch wirkende membranintegrierende Proteindomäne codiert, eine zweite DNA-Sequenz (DNA-Proteinsequenz), die für ein rekombinantes Protein kodiert, sowie eine unter davon getrennter Kontrolle stehenden DNA-Sequenz (DNA-Lysegen), die für ein lytisch wirkendes Membranprotein aus Bacteriophagen oder ein lytisch wirkendes Toxin-release-Gen oder für deren lytisch wirkenden Teile kodiert, enthält.

Als DNA-Targetsequenzen werden DNA-Sequenzen bevorzugt, welche für das L'- Protein oder E'- Protein kodieren. Ebenso geeignet sind DNA-Sequenzen, die für von diesen Proteinen abgeleiteten Aminosäuresequenzen mit gleicher Sekundärstruktur kodieren. Diese Sequenzen sind vorzugsweise durch DNA-Sequenzen verbunden, die für hydrophile Proteindomänen mit 2 bis 30 Aminosäuren und ungeordneter Sekundärstruktur codieren.

In einer bevorzugten Ausführungsform enthält die DNA-Lysesequenz die DNA-Sequenz des E-Proteins, die DNA-Sequenz des L-Proteins oder die DNA-Sequenz des EL-Hybridproteins (Sequenzen vgl. EP-A 0 291 021). Ebenso geeignet sind Teilsequenzen davon, die lytisch wirken.

Die DNA-Proteinsequenz ist vorzugsweise die DNA-Sequenz eines viralen Antigens (z. B. HIV, HBV, EBV) oder eines rekombinanten Humanproteins.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines trägergebundenen, rekombinanten Proteins, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß in gramnegativen Bakterien ein Fusionsprotein, welches mindestens eine hydrophobe, nicht lytisch wirkende, membranintegrierende Proteindomäne sowie ein rekombinantes Protein enthält und ein lytisch wirkendes Membranprotein aus Bakteriophagen oder eines lytisch wirkenden Toxinrelease Gens oder lytisch wirkender Teilsequenzen davon exprimiert werden und das trägergebundene, rekombinante Protein aus der Kulturbrühe gewonnen wird. Die Transformation und Expression kann nach den dem Fachmann geläufigen Verfahren erfolgen. Vorzugsweise erfolgt die Transformation durch Elektroporation oder Konjugation.

Vorzugsweise wird während der Fermentation zunächst die Aktivität des lytischen Proteins inhibiert oder die Expression des Lysegens reprimiert und erst zu einem gewünschten Zeitpunkt, vorzugsweise in der späten logarithmischen Phase, die Inhibition oder Repression aufgehoben.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird das so gewonnene trägergebundene, rekombinante Protein mit einem gegebenenfalls derivatisierten Bindungspartner für das Protein inkubiert und das entstandene Konjugat isoliert. Als Bindungspartner sind die oben genannten Partner der Bindungspaares geeignet.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform werden die Gene von mindestens zwei verschiedenen rekombinanten Proteinen erfindungsgemäß exprimiert. Dadurch können Immunogene oder Vakzine erhalten werden, die mehrere antigene Strukturen aufweisen. Besonders bevorzugt ist es hierbei, als rekombinante Proteine die antigenen

Determinanten von verschiedenen Viren oder Retroviren (z.B. HIV1, HIV2, HBV und EBV) zu verwenden. Zur Expression können diese Gene in einem Expressionsvektor entweder als offener Leserahmen in 3'-Richtung nach dem Gen der Targetsequenz angeordnet sein oder es kann für jedes zu exprimierende rekombinante Protein ein eigener Vektor verwendet werden. In diesem Fall ist es jedoch erforderlich, daß die Vektoren mit jeweils anderen origins of replication und anderen Resistenzgenen versehen sind.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von Antikörpern, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß ein Säugetier mit einem trägergebundenen, rekombinanten Protein, welches erhältlich ist durch Expression eines Fusionsprotein in gramnegativen Bakterien und welches mindestens eine hydrophobe, nicht lytisch wirkende membran-integrierende Proteindomäne sowie das rekombinante Protein enthält, gegebenenfalls dazu verzögerter Expression eines lytisch wirkenden Membranproteins aus Bacteriophagen oder eines lytisch wirkenden Toxin-release Gens oder lytisch wirkender Teilsequenzen davon immunisiert wird und die Antikörper aus dem Serum oder der Milz nach bekannten Verfahren gewonnen werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden B-Lymphozyten der immunisierten Tiere in Gegenwart von transformierenden Agenzien mit einer geeigneten Zelllinie fusioniert, die Zelllinie, welche die gewünschten Antikörper produziert, kloniert und kultiviert und aus den Zellen oder dem Kulturüberstand die monoklonalen Antikörper gewonnen.

Es hat sich gezeigt, daß das erfindungsgemäße Verfahren besonders zur Herstellung von viralen Immunogenen, wie z.B. HIV-Immunogenen, HBV-Immunogenen, geeignet ist.

Ebenso hat sich überraschenderweise gezeigt, daß rekombinante Antigene, die bei der Expression in Prokaryonten üblicherweise in inaktiver Form als refractile bodies anfallen (z.B. Humanproteine wie tPA oder G-CSF) bei der Expression nach dem erfindungsgemäßen Verfahren in ihrer Aktivität und damit in ihren antigenen Strukturen erhalten bleiben. Damit erweist sich das erfindungsgemäße Verfahren als besonders vorteilhaft bei der Herstellung immunogener rekombinanter Humanproteine.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der erfindungsgemäßen trägergebundenen rekombinanten Proteine als Impfstoffe (Vakzine) und zur Stimulierung von T-Lymphozyten.

Die erfindungsgemäßen Impfstoffe können in üblicher Weise hergestellt und verwendet werden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von Impfstoffen unter Verwendung der erfindungsgemäßen trägergebundenen, rekombinanten Proteine. Die Herstellung dieser Impfstoffe kann nach den bekannten Methoden durchgeführt werden. Bevorzugt wird jedoch das trägergebundene, rekombinante Protein zunächst lyophilisiert und anschließend, ggf. unter Zusatz von Hilfsstoffen, suspendiert.

Es ist weiter bevorzugt, das Vakzin als multivalentes Vakzin zu formulieren. Hierzu kann das erfindungsgemäße trägergebundene rekombinante Protein mehrere an der

Membran des Bakterienghosts immobilisierte rekombinante Antigene enthalten.

Die Impfung mit dem erfindungsgemäßen Vakzin kann auf die jedem Fachmann geläufigen Methoden erfolgen, beispielsweise intradermal, intramuskular, intraperitoneal, intravenös, subkutan, oral und intranasal.

Zur intramuskulären oder subkutanen Gabe kann das Vakzin beispielsweise in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert sein. Zur intranasalen oder intraoccularen Applikation kann das Vakzin, beispielsweise in Form eines Sprays oder einer wäßrigen Lösung angewendet werden. Für lokale, beispielsweise orale Gabe ist es häufig erforderlich, die Immunogene zeitweise gegen Inaktivierung zu schützen, beispielsweise gegen saccharolytische Enzyme in der Mundhöhle oder gegen proteolytische Enzyme im Magen. Ein derartiger vorübergehender Schutz kann beispielsweise durch Verkapselung der Immunogene erfolgen. Diese Verkapselung kann beispielsweise durch Überziehen mit einem Schutzmittel (Mikroverkapselung) oder bei Einbettung einer Vielzahl von erfindungsgemäßen Immunogenen in einen schützenden Träger (Makroverkapselung) erfolgen.

Das Verkapselungsmaterial kann semipermeabel sein oder beim Einbringen in den menschlichen oder tierischen Körper semipermeabel werden. Üblicherweise wird für die Verkapselung eine biologisch abbaubare Substanz als Träger verwendet.

Die nachfolgenden Beispiele, Abbildungen und Sequenzprotokolle erläutern die Erfindung weiter.

Fig.1 zeigt schematische Darstellungen der Plasmide pkSELS, pML1 und pMTVL

Fig.2 Schematische Darstellung eines Bakterienghosts, als Träger rekombinanter Proteine

- a) Längsschnitt durch ein gramnegatives Bakterium (om: äußere Membran; pp: periplasmatischer Raum, im: innere (cytoplasmatische) Membran, cp: Cytoplasma).
- b) Ausbildung eines transmembranen Lysetunnels.
- c) Durch den Lysetunnen ausströmendes Cytoplasma.
- d) Bakterienghost mit Fusionsproteinen, die im Zellwandkomplex über Targetsequenzen verankert sind.

Beispiel 1**N-terminales Membrantargeting für HIV 1 gp41.**

Aus dem Plasmid pHF14 wird ein HIV 1 spezifisches DNA-Fragment durch einen partiellen HincII/PvuII Verdau als ein 1445bp DNA-Fragment isoliert. Das Fragment enthält die gesamte Sequenz von gp41, (345 Codons von gp41) Linker Sequenzen, die letzten 45 Codons von gp120. Es entspricht den Nucleotiden 4 bis 1448 aus SEQ ID NO: 1.

Nach Linearisieren von Plasmid pKSEL5 (SEQ ID NO:6) mit AccI und Auffüllen der überhängenden DNA-Enden mit Klenow Polymerase wird das HIV1 spezifische DNA-Fragment mit diesem linearisiertem Plasmid ligiert. Das entstandene Plasmid wird mit pHIE1 bezeichnet und enthält in frame eine Fusion einer Teilsequenz des E-Gens (E'-Targetsequenz) von PhiX174 mit dem oben genannten HIV1-Fragment, wobei das natürliche Stoppcodon des HIV1 env-Gens erhalten bleibt.

Beispiel 2**N- sowie C- terminales Membrantargeting von HIV1 gp41.**

Aus Plasmid pHF14 wird durch HincII-Verdau ein 1059 bp HIV1 spezifisches DNA-Fragment isoliert. Dieses Fragment enthält 5'-seitig Linker Sequenzen gefolgt von 45 Codons aus gp120 sowie 301 Codons von gp41. Es entspricht den Nucleotiden 4 bis 1062 aus SEQ ID NO:1. Nach Linearisieren von Plasmid pKSEL5 mit AccI und nach Auffüllen der überstehenden DNA-Enden mit Klenow Polymerase wurde das HIV1 spezifische DNA-Fragment mit diesem Vektor ligiert. Das entstandene Plasmid pHIE3

- 17 -

enthält eine in frame Fusion einer Teilsequenz des E-Gens (E'-Targetsequenz) mit einer HIV Teilsequenz und einer Teilsequenz des L-Gens (L'-Targetsequenz).

Beispiel 3

C-terminales Membrantargeting von HIV1 gp41.

Aus Plasmid pHF14 wird mit SalI und HincII ein 1061 bp DNA-Fragment isoliert. Dieses Fragment enthält 5'-seitig Linker Sequenzen gefolgt von 45 Codons gpl20 sowie 301 Codons gp41. Es entspricht den Nucleotiden 2 bis 1062 aus SEQ ID NO: 1. Nach Entfernen der E'-Sequenz aus dem Plasmid pKSEL5 durch XhoI/AccI-Verdau werden mit Hilfe von Klenow Polymerase die überstehenden DNA-Enden des Vektors und des isolierten HIV1 Fragment aufgefüllt und ligiert. Das entstandene Plasmid pHIE5 enthält eine in frame Fusion der ersten 5 Codons des lacZ-Gens, Polylinker Codons, gpl20/gp41 Codons und Polylinker Codons gefolgt von der L'-Targetsequenz.

Beispiel 4**C-terminales Membrantargeting von Streptavidin.**

Das 498 bp mit Klenow Polymerase aufgefüllte XbaI-Fragment (FXaStrpA, Nucleotid 2 bis 499 von SEQ ID NO:2) aus pFN6 wird in das Plasmid pKSEL5, aus welchem das E'-Gen-Fragment durch Schnitt mit HincII/XhoI deletiert wurde, in die aufgefüllten Schnittstellen ligiert. Das erhaltene Plasmid wird mit pAV5 bezeichnet. Damit ergibt sich im Plasmid pAV5 eine in frame Fusion der ersten 5 Codons des LacZ-Gens, 26 Aminosäurecodons aus der verbleibenden Polylinker Sequenz sowie der Aminosäuresequenzen des FXaStrpA-Anteils gefolgt von der L'Targetsequenz.

Beispiel 5**N-terminales Membrantargeting von Streptavidin.**

Aus Plasmid pFN6 wird nach BamHI-Verdau das 5'-seitig um eine Faktor Xa-Proteasen-Schnittstelle erweitertes Streptavidin-Gen als 511 bp Fragment isoliert. Es enthält Nucleotid 14 bis 524 aus SEQ ID NO:2. Dieses DNA-Fragment wird nach Auffüllen der Enden mit Klenow Polymerase in die aufgefüllte XbaI Schnittstelle des Vektors pKSEL5 zwischen die E' und L' Targetsequenzen integriert. In Plasmid pAV1 ist damit in frame eine Gen-Fusion aus der E'-Targetsequenz und der FXaStrpA-Sequenz erfolgt. Die 3'-seitig des Streptavidins vorkommenden Stopcodons bleiben durch die vorgenommene Klonierung erhalten.

Beispiel 6**N- und C- terminales Membrantargeting von Streptavidin.**

Die in Plasmid pAV1 hinter dem Streptavidin-Gen vorkommenden Stoppcodons 5'-TAATAA-3' werden durch die Deletion eines 33bp großen DNA-Fragments, das durch partiellen HincII und nachfolgenden XbaI Verdau erzeugt wird, entfernt. Die Streptavidinspezifische DNA-Sequenz enthält Nucleotid 14 bis 499 aus SEQ ID NO:2. Nach Auffüllen der Plasmid-Enden mit Klenow Polymerase und Religation, fusioniert die auf dem Vektor enthaltene L'-Targetsequenz in frame an die E'-Targetsequenz und die FXaStrpA-Sequenz (Plasmid pAV3). Das entsprechende Genprodukt verfügt damit über eine N- sowie C-terminale Targetsequenz.

Beispiel 7**N-terminales Membrantargeting von β -Galactosidase.**

Aus dem Plasmid pMC1403 (J. Bacteriol. 143 (1980) 971 - 980) wird mit Hilfe von PstI und DraI ein 3124 bp DNA-Fragment (SEQ ID NO:3) isoliert und gerichtet in die PstI und NruI Restriktionsstellen des Plasmids pKSEL5 ligiert. Das entstandene Plasmid pLZ1 enthält die ersten 54 Codons der E'-Targetsequenz, 13 Linker-Codons und 1015 Codons des LacZ Gens. Das für Plasmid pLZ1 verwendete PstI/DraI-Fragment erstreckt sich im Sequenzprotokoll SEQ ID NO: 3 von Nucleotid 26 bis einschließlich 3149 und umfaßt 3124bp.

Beispiel 8**N- und C- terminales Membrantargeting von β -Galactosidase.**

Aus Plasmid pMC1403 wird das 3010 bp LacZ DNA-Fragment (PstI - EcoRI, Nucleotide 26 bis 3035 aus SEQ ID NO: 3) isoliert und in die PstI/HindIII Restriktionsstelle von pKSEL5 nach Auffüllen der EcoRI bzw. HindIII Enden gerichtet integriert. Damit ergibt sich in dem so erhaltenen Plasmid pLZ3 eine Fusion in frame der E'-Targetsequenz mit dem LacZ-Gen und der L'-Targetsequenz.

Beispiel 9**C-terminales Membrantargeting von β -Galactosidase.**

Plasmid pLZ3 wird mit EcoRI und partiell mit AccI verdaut. Dadurch wird die E'-Targetsequenz entfernt. Das Fragment enthält die Nucleotide 29 - 3035 aus SEQ ID NO:3 und ist 3007 bp lang (nach Auffüllen der EcoRI-Schnittstelle). Nach Auffüllen der überstehenden DNA-Enden des Vektors und Religation ergibt sich der Vektor pLZ5 in welchem ein lacZ-L'-Fusionsgen vorliegt und dessen Genprodukt über C-terminale Membrantargetsequenz verfügt.

Beispiel 10

Herstellung der trägergebundenen rekombinanten Proteine über die Plasmide pMTV1 (SEQ ID NO:4), pkSEL und pMLL (SEQ ID NO:5).

Auf den Plasmiden pMTV1 und pMLL befindet sich eine Lysekassette, bestehend aus dem Lambda cI857 Repressor-Gen, dem rechtsseitigen Lambda-promotor/Operator System pR sowie dem PhiX174 Lysegen E.

Die Integration des Fremdgens kann in der multiple cloning site mcs 2 für pMTV1 oder pkSEL5 (Fig.1) erfolgen. Dabei wird in analoger Weise wie in den Beispielen 1 - 9 beschrieben vorgegangen.

Beispiel 11**Fermentation und Lyse**

Das Plasmid wird in *E. coli* K12 (DSM 2093) integriert und die Kultur im Schüttelkolben bis zu OD 0,8 - 1,2 bei 600 nm angezogen, wobei die Expression des Lysegens E durch cI857 Repressormoleküle reprimiert ist (Eur. J. Biochem. 180 (1989) 393 bis 398). Durch Temperaturerhöhung auf 42°C während der exponentiellen Wachstumsphase der Bakterien erfolgt die Expression von Gen-E durch thermische Inaktivierung der cI857 Repressormoleküle. Die durch Protein E verursachte Lyse von *E. coli* setzt je nach Kulturmedium (Voll- oder Minimalmedium, unter Belüftung im Schüttelwasserbad) der Bakterien zwischen 10 bis 30 min nach Temperaturerhöhung ein. Nach weiteren 10 bis 30 min ist die Lyse vollständig.

Beispiel 12**Modifizierte Protein E-Lyse.**

Es wird wie in Beispiel 11 kultiviert, wobei jedoch 30 min. vor Temperaturerhöhung von 28°C auf 42°C das Kulturmedium durch Zugabe von Magnesiumsulfatlösung auf 0,2 mol/l Magnesiumsulfat gebracht wird. Dies verhindert trotz Expression von Gen E die Lyse der Bakterien.

30 min. nach Temperaturerhöhung werden die Zellen durch Zentrifugation geerntet. Durch Resuspension des Zellpellets in niedermolarem Puffer (PBS, 1 mmol/l Phosphatpuffer, 1 bis 10 mmol/l Tris - HCl pH 6 - 8) oder Wasser erfolgt eine sofortige Lyse der Zellen. Die dabei anfallenden Zellhüllen werden als Bakterienghosts bezeichnet. Bei diesen Bedingungen, die einer Kombination von Protein E-Lyse und osmotischem Schock entsprechen, wird eine größere Lysestruktur in den Bakterien erreicht. Die Morphologie der Bakterienghosts bleibt auch unter diesen Bedingungen weitgehend erhalten.

Zur Reinigung werden die Bakterienghost 2 x mit PBS oder 0,9 % NaCl gewaschen (resuspendieren und zentrifugieren) und gefriergetrocknet.

Beispiel 13Immunisierung

10^9 Keime (entsprechend 1 mg Bakterienghosts Trockengewicht) pro Maus werden in 0,9 % NaCl intraperitoneal 4 x in monatlichen Abständen zur Immunisierung gegeben. 8 Tage nach der letzten Immunisierung wird Serum gewonnen und die Antikörper werden isoliert.

Beispiel 14Bindung von biotinyliertem HBc-Antigen

Nach Beispiel 4 hergestellte Bakterienghosts, in die Streptavidin über Targetsequenzen integriert ist, werden lyophilisiert. 1 mg dieses Lyophilisats wird 10 ml einer Lösung von 20 Ig/ml eines Konjugats aus Hepatitis B core-Antigen und Biotin (hergestellt durch Reaktion von HBcAg mit N-Hydroxysuccinimid-aktiviertem Biotin) in 40 mmol/l Phosphatpuffer, pH 7,4, 30 min inkubiert und anschließend mehrfach mit 40 mmol/l Phosphatpuffer, pH 7,4, gewaschen. Auf diese Weise wird ein trägergebundenes HBcAg-Immunogen erhalten, das zur Immunsierung und Gewinnung von Antikörpern verwendet werden kann.

Sequenzprotokolle

SEQ ID NO:1

ART DER SEQUENZ:Nucleotidsequenz HIV1(gp120/gp41)
SEQUENZLÄNGE:1451 Basenpaare

STRANGFORM: Einzelstrang

gtogacctgc	aggcatgcaa	gctGATCTTC	AGACCTGGAG	GAGGAGATAT	GAGGGACAAT	60
TGGAGAAGTG	AATTATATAA	ATATAAAGTA	GTAAAAATTG	AACCATTAGG	AGTAGCACCC	120
ACCAAGGCAA	AGAGAAAGAGT	GGTGCAGAGA	AAAAAAAGAG	CAGTGGGAAT	AGGAGCTTIG	180
TTCCTTGGGT	TCTTGGGAGC	ACCAGGAAGC	ACTATGGGCG	CAGCGTCAAT	GACGCTGACG	240
GTACAGGCCA	GACAATTATT	GTCIGGTATA	GTGCAGCAGC	AGAACAAATT	GCTGAGGGCT	300
ATTGAGGGCC	AACAGCATCT	GTIGCAACTC	ACAGTCTGGG	GCATCAAGCA	GCTCCAGGCA	360
AGAAATCCTGG	CTGTGAAAG	ATACCTAAAG	GATCAACAGC	TCCTGGGGAT	TTGGGGTTGC	420
TCIGGAAAC	TCATTGAC	CACTGCTGTG	CCTTGGGAATG	CTAGTGGAG	TAATAAATCT	480
CTGGAACAGA	TTTGGATAA	CATGACCTGG	ATGGAGTGGG	ACAGAGAAAT	TAACAATTAC	540
ACAAGCTTAA	TACACTCCIT	AAITGAAGAA	TOGAAAACC	ACCAAGAAAA	GAATGAACAA	600
GAATTATIGG	AATTAGATAA	ATGGGCAAGT	TIGTGGAAIT	GGTTAACAT	AACAAATTGG	660
CTGTGGTATA	AAAAATTATT	CATAATGATA	GTAGGAGGCT	TGGTAGGTT	AAGAATAGTT	720
TTTGTGTAC	TTTCTATAGT	GAATAGAGTT	AGGCAGGGAT	ATTCAACATT	ATCGTTTCAG	780
ACCCACCTCC	CAAACCOGAG	GGGACCCGAC	AGGOCOCGAAG	GAATAGAAGA	AGAAGGTGGA	840
GAGAGAGACA	GAGACAGATC	CATTGATTA	GIGAACGGAT	CCTTAGCACT	TATCIGGGAC	900
GATCTGOGGA	GCCTGTGCT	CTTCAGCTAC	CACOGCTGAA	GAGACTTACT	CTTGATTGTA	960
ACGAGGATTG	TGGAACCTCT	GGGACGCAGG	GGGTGGGAAG	CCCTCAAATA	TTGGTCCAAT	1020
CTCCTACAGT	ATGGAGTCA	GGAACTAAAG	AATAGTGTG	TTAACCTGCT	CAATGCCACA	1080
GCTATAGCAG	TAGCTGAGGG	GACAGATAGG	TTATAGAAT	TAGTACAAGC	AGCTTATAGA	1140
GCCATTOGCC	ACATACTAG	AAAGATAAGA	CAGGGCTTGG	AAAGGATTTT	GCTATAAAGat	1200
gggtggcaag	tggtaaaaaa	gtagtgtgt	tggatggct	gctgttaaggg	aaagaatgag	1260
aogagctgag	ccagcagcag	atgggggtggg	agcagtatct	cgagacctag	aaaaacatgg	1320
agcaatcaca	agtagcaata	cagcagctac	caatgcogat	tgtgcttggc	tagaagcaca	1380
agaggaggag	gaggtgggtt	ttccagtcac	acctcaggtt	ccttaagac	aatgactta	1440
caaggcagct	g					1451

In Großbuchstaben dargestellt ist der C-Terminus von gp160 von HIV1 (Originalkoordinaten des BH8-Klons: 7199 bis 8372 (nach Ratner et al. 1985)). Nach den 45 letzten Codons des C-Terminus von gp120 (5'-ATCTTCAGA GAAAAAGA-3') folgen die 345 Codons des gp41 (5'-GCAGTGGGAA.....TTTGCTATAA-3'). 5'-seitig der HIV1-Sequenz erstreckt sich der für die folgenden Klonierungen verwendete Polylinker.

Referenz: Ratner, L., Haseltine, W., Patarca, R., Livak, K.J., Starich, B., Josephs, S.F., Doran, E.R., Rafalski, J.A., Whitehorn, E.A., Baumeister, K., Ivanoff, L., Petteway, Jr. S.R., Pearson, M.L., Lautenberger, J.A., Papas, T.S., Ghayeb, J., Chang, N.T., Gallo, R.C., Wong-Staal, F. 1985. Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III. Nature 313: 277 - 284.

SEQ ID NO:2

ART DER SEQUENZ:Nucleotidsequenz (FXa-StrpA)

SEQUENZLÄNGE:525 Basenpaare

STRANGFORM:Einzelstrang

DNA sequence FXa-StrpA 525 b.p. complete sequence :

tctagaacta gtggatccat cgagggttagg tctATGGACC CGTCCAAGGA CTCCAAAGCT 60
CAGGTTTCIG CAGCOGAAGC TGGTATCACT GGACCCIGGT ATAACCAACT GGGGTGACT 120
TTCATTGIGA CGCGTGGTGC GGACGGAGCT CTGACTGGCA CCTACGAATC TGOGGTGGT 180
AAOGCAGAAAT CGCGTACGT ACTGACTGGC CGTTATGACT CTGACACCTGC CACCGATGGC 240
TCTGGTACCG CTCTGGGCTG GACGTGGCT TGGAAGAACAA ACTATCGTAA TGOGCACAGC 300
GCCACTACGT GGTCTGGCCA ATAOGTIGGC GGTGCTGAGG CTGCTATCAA CACTCAGTGG 360
CTGTTAACAT CGGCACTAC CGAAGGGAAT GCATGGAAAT CGACACTAGT AGGTCTATGAC 420
ACCTTACCA AAGTTAAGCC TTCTGCTGCT AGCATTGATG CTGCCAAGAA AGCAGGGTAA 480
AACAAOGGTA ACCCTCTAGA CGCTGTTCAAG CAATAAtaag gatcc 525

In Großbuchstaben dargestellt ist die Streptavidinsequenz (Argarana et al. 1986). Die für die Faktor Xa-Spaltstelle Ile-Glu-Gly-Arg kodierende DNA-Sequenz 5'-atcgagggttagg-3' reicht in der hier aufgeführten Sequenz von Nukleotid 19 bis 30.

Referenz :

Argarana, C.E., Kuntz, I.D., Birken, S., Axel, R., Cantor, Ch.R. 1986.
Molecular cloning and nucleotide sequence of the streptavidin gene.
Nucl. Acids Res. 14 (4): 1871 - 1882.

SEQ ID NO:3

ART DER SEQUENZ:Nucleotidsequenz (LacZ)
SEQUENZLÄNGE:3152 Basenpaare

STRANGFORM: Einzelstrang

ATGACCATGA	TTAOGAATTG	CTGCAGGTG	ACGGATCCCG	TOGTTTTACA	ACGTGCGAC	60
TGGAAAACC	CTGGCGTTAC	CCAACCTTAAT	CGCCCTTGCAG	CACATCCCCC	TTTGGCCAGC	120
TGGCGTAATA	CGGAAGAGGC	COGCACCGAT	CGCCCTTCCC	AAACAGTGGC	CAGCCCTGAAT	180
GGGAATGGC	GCTTTGCGTG	GTTCGCGGA	CCAGAAGOGG	TGCGGAAAG	CTGGCTGGAG	240
TGGCGATCTTC	CTGAGGCGA	TACTGCGTC	GTCCCCCTCAA	ACTGGCAGAT	GCACGGCTAC	300
GATGCGGCCA	TCTACACCAA	CGTAACCTAT	CCCATTAACGG	TCAATCOGCC	GTITGTTCCC	360
ACGGAGAAC	CGAOGGGTIG	TTACTCGCTC	ACATTTAATG	TTGATGAAAG	CTGGCTACAG	420
GAAGGCCAGA	CGCGAATTAT	TTTTGATGGC	GTAACTCGG	CGTTTCATCT	GTGGTGCAAC	480
GGGCGCTGGG	TOGGTTACGG	CCAGGACAGT	CGTTTGGCGT	CTGAATTGTA	OCTGAGGCGA	540
TTTTTAOOGOG	COGGAGAAAA	CGOCTCGOG	GIGATGGTGC	TGCGTTGGAG	TGAOGGCAGT	600
TATCTGGAAG	ATCAGGATAT	GTGGGGGATG	AGOGGCATT	TCCGTTGACGT	CTCGTTGCIG	660
CATAAAACCGA	CTACACAAAT	CAGCGATTTC	CATGTTGCCA	CTCGCTTAA	TGATGATTTC	720
AGCCCGCGCTG	TACTGGGAGGC	TGAAGTTCAAG	ATGIGCGGGG	AGTTGCGTGA	CTACCTAOGG	780
GTAACAGTTT	CTTTATGGCA	GGGTGAAAAG	CAGGTGCGCA	GOGGCACCGC	GCGTTTGGC	840
GGTGAATTAA	TOGATGAGOG	TGGTGGTTAT	CGCGATOGCG	TCACACTACG	TCTGAAOGTC	900
GAAAACCGA	AACTGTTGGAG	CGCGGAAATC	CGAATCTCT	ATCGTGGGGT	GGTTGAACTG	960
CACACCGCG	ACGGCAOGCT	GATTGAAGCA	GAAGCGTGGG	ATGTOGGTTT	CCGCGAGGTG	1020
CGGATTGAAA	ATGGTCIGCT	GCTGCTGAAC	GGCAAGCGT	TGCTGATTG	AGGCGTAAAC	1080
CGTCACGAGC	ATCATCCCTCT	GCATGGTCAG	GTCACTGGATG	AGCAGACGAT	GGTGCAGGAT	1140
ATCCCTGCTGA	TGAAGCAGAA	CAACCTTAAC	CGCGTGGGCT	GTTCGCTTAA	TCCGAACCAT	1200
CGCGTGTGGT	ACAOGCTGIG	CGACCGCTAC	GGCGCTGTATG	TGGTGGATGA	AGCCAATATT	1260
GAAACCCAG	GCATGGTGCC	AAATGAATG	CTGACOGATG	ATCGOGCTG	GCTACOGGGG	1320
ATGAGCGAAC	GGTAAACGGG	AAATGGTGCAG	CGCGATGTA	ATCACCOGAG	TGTGATCATT	1380
TGGTGGCTGG	GGAAATGAATC	AGGCCAOGGC	GCTAATCAAG	AOGCGCTGTA	TCGCTGGATC	1440
AAATCTGTOG	ATCCTTCCCG	COOGGTCAG	TATGAAGGCG	GGGGAGCGA	CACCAOGGCC	1500
ACCGATATTA	TTTGGCCGAT	GTACGGCGGC	GTGGATGAAAG	ACCAGCCCTT	CCCGGCTGIG	1560
CGGAAATGGT	CCATCAAAAA	ATGGCTTTG	CTACCTGGAG	AGACCGOGCC	GCTGATCCCT	1620
TGCGAATAOG	CCCAACCGAT	GGGTAAACAGT	CTTGGGGGTT	TOGCTAAATA	CTGGCAGGGG	1680
TTTGTGCACT	ATCCCCGTTT	ACAGGGCGGC	TTGCTCTGGG	ACTGGGTGGA	TCACTGCGT	1740
ATTTAAATATG	ATGAAAACGG	CAACCGTGG	TOGGCTTACG	GGGGTGAATT	TGGCGATAACG	1800
CGAACCGATC	GGCAGTTCTG	TATGAAACGGT	CTGGCTTTG	COGACCGCAC	GCGCATCCA	1860
GGCGTGAOGG	AAGCAAAACA	CCAGCAGCGAG	TTTTTCCAGT	TCGGTTTATC	CGGGCAAACC	1920
ATCGAAGTGA	CCAGCGAATA	CCCTGTCGGT	CATAGCGATA	ACGAGCTCT	GCACCTGGATG	1980
GTGGCGCTGG	ATGGTAAAGCC	GCTGGCAAGC	GGTGAAGTGC	CTCTGGATGT	CGCTOCACAA	2040
GGTAAACAGT	TGATTGAACT	GGCTGAACTA	CGCGAGCGG	AGAGCGCGG	GCAACTCTGG	2100
CTCACAGTAC	GGTGTAGTGC	ACCGAACCGG	ACCGCATGGT	CAGAAGCGG	GCACATCAGC	2160
GCCCTGGCAGC	AGTGGCGTCT	GGGGGAAAC	CTCAGTGTGA	OGCTCCCGC	CGCGTCCAC	2220
GCCATCCCGC	ATCTGACAC	CAGCGAAATG	GATTTTTCGA	TOGAGCTGGG	TAATAAGCGT	2280
TGGCAATTAA	ACGCCAGTC	AGGCTTTCTT	TCACAGATGT	GGATTGGCGA	AAAAAAACAA	2340
CTGCTGACGC	CGCTGCGCGA	TCAGTTCAAC	CGTGCACCGC	TGGATAACGA	CATGGCGTA	2400
AGTGAAGOGA	CGCGCATTTA	CCCTAAOGCC	TGGGTOGAAC	GCTGGAAAGC	GGGGGGCCAT	2460
TACCAAGGCG	AAGCAGCGTT	GTTCGAGTGC	ACGGCAGATA	CACTTGTGA	TGCGGTGCTG	2520
ATTAOGACCG	CTCAACCGTG	GCAGCAGTCA	GGGAAAACCT	TATTTATCAG	CGCGAAAACC	2580
TACCGGATTG	ATGGTAACTGG	TCAAATGGCG	ATTAACCGT	ATGTTGAAGT	GGCGAGCGAT	2640
ACACCGCAGTC	CGGGCGCGGAT	TGGCCTGAAAC	TGCCAGCTGG	CGCAGGTAGC	AGAGCGGGTA	2700
AACTGGCTOG	GATTAGGGCC	GCAAGAAAAC	TATCCCGAC	GCCTTACTGC	CGCTGTTTT	2760

GACOGCTGGG ATCTGCCATT GTCAGACATG TATAACCGT ACGCTTCCC GAGGGAAAAC 2820
GGCTCTGCGCT GGGGAOGCG OGAATTGAAT TATGGCCCAC ACCAGTGGCG CGGGCGACTTC 2880
CAGTCAACA TCAGCGCTA CAGTCAACAG CAACTGATGG AAACCCAGCCA TOGCCATCTG 2940
CTGCAOGCGG AAGAAGGCAC ATGGCTGAAT ATCGACGGTT TCCATATGGG GATITGGTGGC 3000
GAGGACTCTT GGAGCCCGTC AGTATCGCG GAATTCCAGC TGAGCGCGGG TOGCTACCAT 3060
TACCACTTGG TCTGGTGTCA AAAATAAataa taacoggca ggcatgtct gccogtattt 3120
cgogtaagga aatccattat gtactattta aa 3152

In Großbuchstaben ist die DNA-Sequenz für das LacZ-Gen aus Plasmid pMC 1403 dargestellt.

Referenz : Casadaban, M.J., Chou, J., Cohen, M.S. 1980. In vitro gene fusions that join an enzymatically active β -galactosidase segment to amino-terminal fragments of exogenous proteins: Escherichia coli plasmid vectors for the detection and cloning of translational initiation signals. J. Bacteriol. 143: 971 - 980.

-28-

SEQ ID NO: 4

ART DER SEQUENZ: Nucleotidsequenz (pMTV1)
SEQUENZLÄNGE: 5314 Basenpaare

STRANGFORM: Einzelstrang

AAATITGAAA	CGTTAATATT	AGACATAATT	TATCCTCAAG	TAAGGGCG	AAGCCCTG	60
AATTAAAATT	GTGACCAACC	TACATACCAA	AGAOGAGOGC	CTTAACTCTT	GCCCTTAGTA	120
CCTCGCAACG	GCTGGGACG	ACCAGGGCGA	GCGOCAGAAC	GTTTTTAC	TTAGACATT	180
ACATCACI	CC	TT	GCACGT	TTCTGOGTCA	GTAAGAACGT	240
CAGTGT	TT	CC	GG	TTCA	ACOGGAC	300
GCTGACGCC	ATTAATAATG	TTTTCGTTAA	ATTCA	TTCCATGATG	AGACAGGCG	360
TTTGAATGTT	GA	GGGATGA	ACATAATAAG	CAATGACGGC	AGCAATAAAC	420
CAGGAAAGCG	AGGGTATCCC	ACAAAGTCA	GGTACCAT	AAOGCAAGCC	TCAACGGCAGC	480
GAOGAGCA	AGAGGGTCA	GTAGCAATCC	AAAC	ACTCGTCAGA	AAATCGAAAT	540
CATCTTGGT	TA	AA	CCAAA	AGCTAGAGGA	TCTTTAGCTG	600
TCTTGGTTT	CC	AA	AGCG	TTATG	AAAGGAAAT	660
CTCCCTAGTA	CATGCAACCA	TTATCACCGC	CAGAGGTAAA	ATAGTCACAA	CGCAOGGTG	720
TAGATATT	TCCCCTGGG	TGATAGATT	AA	CACAAAAAAG	AAACCAATTAA	780
CACAAGAGCA	GCTTGAGGAC	GCAOGTOGCC	TTAAAGCAAT	TTATGAAAAA	AAGAAAAAATG	840
AACTTGGCTT	ATCCCAGGAA	TCTGTCGAG	ACAAGATGGG	GATGGGGCAG	TCAGGCGTTG	900
GTGCTT	TAATGGC	ATGCATTAA	ATGCTTATAA	CGCOGCATTG	CITACAAAAA	960
TTCTCAAAGT	TAGCGT	GAA	TTAGCC	CAGAGAAATC	TAOGAGATGT	1020
ATGAAGOGGT	TA	GTG	CG	TGAGTACCC	GTTTTTCTC	1080
ATGTTCA	GGGATG	TCACCTAAC	TTAGAACCTT	TACCAAAGGT	GATGOGGAGA	1140
GATGGGTAAG	CACAAC	AAAGCCAGT	ATTCTGCATT	CTGGCTTGAG	GTTGAAGGTA	1200
ATTCCATGAC	GG	CCACCAACA	GGCTCCAAGC	TGAOGGAATG	TTAATTCTCG	1260
TTGACCC	GA	GGCTG	GAGCCAGG	AGCAGAC	GGGGGIGATG	1320
AGTTACCTT	CAAGAA	ACTG	ATCAGGGATA	GTTTTTACAA	CCACTAAACC	1380
CACAGTACCC	AATGAT	CCCA	TGCAATGAGA	TGIGGGGAA	GTTATCGCTA	1440
GTCAGTGGCC	TGAAGAGACG	TTTGGCTGAT	CGGCAAGG	TTCTGGT	CGCATAGCTG	1500
ATAACAATTG	AGCAAGAATC	TTCATG	GAATT	TCAC	TCAGAACATA	1560
ACATAGTAAA	TGGATT	GA	TGAGAAGAAT	GGTTTTATG	OGACTTACOG	1620
AAAGGGAAAG	ATAC	TTGAA	AGGAAAGGGC	AATT	GGGTTTGT	1680
TAAATCAGCT	CATT	TTAA	CCAATAGGCC	GGAA	ATCCCTTA	1740
GAATAGACCG	AGA	TTGGG	ATGGGAAATT	TTCA	TCAGAACATA	1800
AACTTGGACT	CCAA	CGTCAA	GGGOGAAA	ACCGTCTATC	AGGGOGATGG	1860
GAACCATCAC	CCTA	ATCAAG	TTT	GGG	CCACTACGT	1920
CCTAAAGGGA	GCC	CCCGGATT	TAGAGCT	GGG	GGGAGAAG	1980
GAAGGGAAGA	AA	GGGAAAGG	AGGGGGG	GGG	GGGAGAAG	2040
OGOGTAACCA	CCAC	ACCCCGC	CGG	GGG	GGTCACGCTG	2100
TTCAGGCTAC	GCA	ACTG	GG	GGG	CCATTGCGCA	2160
CTGGOGAAGG	GGGG	ATG	GG	GGG	TTAAGT	2220
TCAOGAOGTT	GT	AAAACGAC	GGCAG	GGG	CCAG	2280
GAGCTCCACC	GGG	TG	G	GGG	GGGGAATTG	2280
TGCGCGATAG	TTAAGCC	AGT	GGG	GGG	TCTGCTCTG	2340
OGCCCCGACA	CC	GGCTTAAT	GGG	GGG	GTCA	2400
COGCTTACAG	ACA	AGCTG	GGG	GGG	GGCTG	2460
CATCACOGAA	AOG	GGG	GGG	GGG	GTG	2520
TAAGCAATTG	CTG	AAAGTC	GGG	GGG	GGG	2580
ATTGAT	AA	TTGAG	GGG	GGG	GGG	2640
TTCTTGTG	TC	TOGACAT	GGG	GGG	GGG	2700
AAGCTTGCAT	GGC	TGCA	GGG	GGG	GGG	2760
GT	TTG	CGAGGT	GGG	GGG	GGG	2820
AATTCA	GGG	CTG	GGG	GGG	GGG	2880

AACATAATAA GCAATGACGG CAGCAATAAA CTCAACAGGA GCAGGAAAGC GAGGGTATCC 2940
 CACAAAGTCC AGOGTACCAT AAACGCAAGC CTCAACGAG OGACGAGCAC GAGAGGGTC 3000
 AGTAGCAATC CAAACTTGT TACTCGTCAG AAAATGAAA TCATCTTCGG TTAAATCCAA 3060
 AACGGCAGAA GCCTGAATGA GAATTCGACC TOGAGGGGGG GCCCGTACCC CAGCTTTGT 3120
 TCCCTTTAGT GACGGTTAAT TCOGAGCTTG GCGTAATCAT GGTATAGCT GTTTCCTGTG 3180
 TGAAATTGTT ATCCGCTCAC AATTCCACAC AACATAGGAG COGGAAGCAT AAAGTGTAAA 3240
 GCCTGGGTG CCTAATGAGT GAGGTAACTC ACATTAATTG OGTTGCGCTC ACTGCGCGT 3300
 TTCCAGTGG GAAACCTGTC GTGCCAGCTG CATTAAATGAA TOGGCCAACG CGGGGGGAGA 3360
 GGGGGTTTGC GTATTGGGOG CTCCTTCGCT TOCTCGCTCA CTGACTCGCT GOGCTGGTC 3420
 GTTOGGCTGC GGOGAGGGT ATCAGCTCAC TCAAAGGGG TAATAOGGT ATCCACAGAA 3480
 TCAGGGGATA ACGCAGGAAA GAACATGTGA GCAAAAGGCC AGCAAAAGGC CAGGAACCGT 3540
 AAAAAGGCCG CGTTCGCTGGC GTTTTCCAT AGGCTGGCC CCCCTGACGA GCATCACAAA 3600
 AATOGACGCT CAAGTCAGAG GTGGCGAAC COGACAGGAC TATAAAGATA CGAGGGTTC 3660
 CCCCTGGAA GCTCCCTGTT GCGCTCTCCT GTTCCGACCC TGCGCTTAC OGGATACCTG 3720
 TCCGCTTTC TCCCTGGG AAGOGTGGG CTTCTCAAT GCTCAOGCTG TAGGTATCTC 3780
 AGTTGGTGT AGGTGTTGCT CTCAGCTG GGCTGTGTC ACGAACCCCC CGTTCAGCCC 3840
 GACOGCTGCG CCTTATCOGG TAACTATGTT CTTGAGTCCA ACCCGTAAG ACACGACTTA 3900
 TOGCCACTGG CAGCAGCCAC TGGTAACAGG ATTAGCAGAG OGAGGTATGT AGGOGGTGCT 3960
 ACAGAGTTCT TGAAGTGGTG GCCTAACTAC GGCTACACTA GAAGGACAGT ATTTGGTATC 4020
 TGOCTCTGC TGAAGCCAGT TACCTTCGGA AAAAGAGTGT GTAGCTCTG ATCCGGAAA 4080
 CAAACCACCG CTGGTAGCGG TGGTTTTTTT GTTGCAAGC AGCAGATTAC GCGCAGAAA 4140
 AAAGGATCTC AAGAAGATCC TTGATCTT TCTAOGGGGT CTGAOGCTCA GTGGAOGAA 4200
 AACTCACGTT AAGGGATTTT GGTCATGAGA TTATCAAAAA GGATCTTCAC CTAGATCTT 4260
 TTAAATTAAA AATGAAGTT TAAATCAATC TAAAGTATAT ATGAGTAAAC TTGGCTGAC 4320
 AGTTACCAAT GCTTAATCAG TGAGGCACCT ATCTCAGOGA TCTGCTTATT TOGTTCATCC 4380
 ATAGTTGCTC GACTGCCGT CGTGTAGATA ACTAOGATAAC GGGAGGGCTT ACCATCTGGC 4440
 CCCAGTGCTG CAATGATACC GCGAGACCCA CGCTCACOGG CTCCAGATT ATCAGCAATA 4500
 AACCAAGCCAG CGGAAGGGC CGAGOGCAGA AGTGGTCTG CAACTTATC CGCTCCATC 4560
 CAGTCTATTAA ATGTTGCGG GGAAGCTAGA GTAAGTAGTT OGCGAGTTAA TAGTTGCGC 4620
 AACGTTGTTG CCATTGCTAC AGGCATOGTG GTGTCACGCT CGTGTGTTGG TATGGCTTCA 4680
 TTCAGCTCOG GTTCCAACG ATCAAGGOGA GTTACATGAT CCCCATGTT GTGAAAAAAA 4740
 GOGGTAGCT CCTTOGGTCC TCGATCGTT GTCAAGAGTA AGTGGCOGC AGTGTATCA 4800
 CTCATGCTTA TGGCAGCACT GCATAATTCT CTIATGTC TGCCTCGGT AAGATGCTTT 4860
 TCTGTGACTG GTGAGTACTC AACCAAGTC TCTGAGAAT AGTGTATGCG GCGACGGAGT 4920
 TGCCTTGGCC CGGCGTCAAT ACGGGATAAT ACGCGOCAC ATAGCAGAAC TTTAAAAGTG 4980
 CTCATCATTG GAAAOGTTC TTGGGGGOGA AAACCTCAA GGATCTTACG GCTGTTGAGA 5040
 TCCAGTTGGA TGTAAACCCAC TCGTGCACCC AACTGATCTT CAGCATCTT TACTTTCAAC 5100
 AGCGTTCTG GGTGAGCAA AACAGGAAGG CAAAATGCG CAAAAAAGGG AATAAGGGCG 5160
 AACACGAAAT GTGAAATCT CATACTCTTC CTTTTCAAT ATTATTGAG CATTATCAG 5220
 GGTTATTGTC TCATGAGOGG ATACATATTG GAAATGTTT AGAAAATAA ACAAAATAGGG 5280
 GTTCCOGCGCA CATTCCCCG AAAAGTGCCA CCTTG 5314

SEQ ID NO:5

ART DER SEQUENZ:Nucleotidsequenz (pML1)
SEQUENZLÄNGE:7641 Basenpaare

STRANGFORM:Einzelstrang

GACGCCGGGC	AAGAGCACT	GGTGGCCGC	ATACACTATT	CTCAGAATGA	CTTGGGTGAG	60
TACTCACCAG	TCACAGAAAA	GCATCTTAAG	GATGGCATGA	CAGTAAGAGA	ATTATGCAGT	120
GCTGCCATAA	CCATGAGTGA	TAACACTGCG	GCCAACTTAC	TTCTGACAAC	GATGGGAGGA	180
CGAAGGAGC	TAACCCCTT	TTTGCACAAC	ATGGGGGATC	ATGTAACCTG	CCCTGATGCT	240
TGGGAACCGG	AGCTGAATGA	AGCCATACCA	AACGAOGAGC	GTGACACCAC	GATGCGTGC	300
GCAATGGCAA	CAACGTGCG	CAAACATATTA	ACTGGGGAAC	TACCTACTCT	AGCTTCCCGG	360
CAACAATTAA	TAGACIGGAT	GGAGGGGAT	AAAGTGGCAG	GACCACTTC	GCGCTOGGCC	420
CTTCGGCTG	GCTGGTTAT	TGCTGATAAA	TCTGGAGCG	GTGAGGGTGG	GTCCTGGGGT	480
ATCAATTGCA	CACTGGGCC	AGATGGTAAG	CCCTCCCGTA	TOGTAGTTAT	CTACAOGACG	540
GGGAGTCAGG	CAACTATGGA	TGAAACGAAAT	AGACAGATCG	CTGAGATAGG	TGCCCTACTG	600
ATTAAGCAIT	GGTAACCTGTC	AGACCAAGT	TACCTCATATA	TACCTTAGAT	TGATTTAAAA	660
CTTCATTTT	AACTTAAAAG	GATCTAGGTG	AAGATCTT	TTGATAATCT	CATGACCAAA	720
ATCCCTTAAC	GTGAGTTTC	GTTCGACTG	GCGTCAGACC	CCTTAATAAG	ATGATCTTCT	780
TGAGATGTT	TTGGCTGCG	CGTAATCT	TGCTCTGAAA	AOGAAAAAAC	OGCCCTGCG	840
GGGGTTTTT	OGAAGGTTCT	CTGAGCTACC	AACTCTTGA	ACCGAGGIAA	CTGGCTTGG	900
GGAGOGCAGT	CACCAAAACT	TGTCTTTCA	GTTTAGCCCT	AAACGGCGCA	TGACTTCAAG	960
ACTAACTCT	CTAAATCAAT	TACCACTGGC	TGCTGCCAGT	GGTGTCTT	CATGCTTTC	1020
CGGGTGGAC	TCAAGACGAT	AGTTACCGA	TAAGGOGCAG	GGTTOGGACT	GAAACGGGGGG	1080
TTGGTGCATA	CAGTCCAGCT	TGGAGCGAAC	TGCTTACCGG	GAACIGAGTG	TCAGGCGTGG	1140
AATGAGACAA	ACGGGGCCAT	AACAGOGGAA	TGACACOOGGT	AAACOGAAAG	GCAGGAACAG	1200
GAGAGOGCAC	GAGGGAGCG	CCAGGGGAAA	CGCCCTGGTAT	CTTTATAGTC	CTGCTGGGTT	1260
TCGCCACCAC	TGATTGAGC	GTCAAGATTC	GIGATGCTTG	TCAGGGGGC	GGAGCCTATG	1320
AAAAAAOGGC	TTTGCCTGGG	CCCTCTCACT	TCCCCTGTA	GTATCTTCT	GGCATCTTCC	1380
AGGAAATCTC	CGCCCGCTC	GTAAAGCCATT	TCCGCTCGCC	GCAGTOGAAC	GACCGAGCGT	1440
ACGGAGTCAG	TGAGOGAGGA	AGOGGAATAT	ATCCCTGATC	ACATATTCTG	CTGAOGCACC	1500
GGTGCAGCT	TTTTCTCCT	GCACATGAA	GCACCTCACT	GACACCCICA	TCAGTGCCTA	1560
CATAGTAAGC	CAGTATACAC	TOGCTAGCG	CTGAGGTCTG	CCTGGTGAAG	AAGGTGTTGC	1620
TGACTCTAC	CAGGCCCTGAA	TOGCCCTAC	ATCCAGOCAG	AAAGTGAAGG	AGCCAOGGTT	1680
GATGAGAGCT	TTGTTGTTAGG	TGGACCAGTT	GGTGAATT	AACTTTGCT	TTGCCAOGGA	1740
ACGGCTGCG	TTGTCGGAA	GTGCGTGT	CTGATCTTC	AACTCAGCAA	AAGTTGATT	1800
TATTCACAA	ACCCACGTTG	TGTCTCAAAA	TCTCTGATGT	TACATTGAC	AAGATAAAAA	1860
TATATCATCA	TGAACAATAA	AACTGCTG	TTACATAAAC	AGTAATACAA	GGGGTGTAT	1920
GAGCCATAIT	CAAACGGAAA	CGCTTCTG	GAGGCGOGGA	TTAAATTCCA	ACATGGGATG	1980
TGATTTATAT	GGGTATAAAT	GGGCTOGOGA	TAATGTOGGG	CAATCAGGTG	OGACAATCTA	2040
TOGATTGTTAT	GGGAAGCGG	ATGOGCCAGA	GTGTTCTG	AAACATGGCA	AAGGTAGCGT	2100
TGCCAATGAT	GTACAGATG	AGATGGTCAG	ACTAAACTGG	CTGACCGAAT	TTATGCCTCT	2160
TCGGACCATC	AAGCATTTA	TOGCTACTC	TGATGATGCA	TGGTACTCA	CCACTGOGAT	2220
CCCOGGGAAA	ACAGCATTCC	AGGTATTAGA	AGAATATCT	GATTCAAGTG	AAAATATTGT	2280
TGATGOGCTG	GCAGTGTCTC	TGCGCGGGT	GCATTGATT	CCTGTTGTA	ATTGCTCTT	2340
TAACAGOGAT	CGCGTATTTC	GTCTCGCTA	GGCGCAATCA	CGAATGAATA	ACGGTTGGT	2400
TGATGOGAGT	GTGTTGATG	AGAGCGTAA	TGGCTGGCT	GTGAAACAAG	TCTGGAAAGA	2460
AATGCATAAG	CTTTGCTCAT	TCTCACOGGA	TTCAGTOGTC	ACTCATGGTG	ATTTCCTACT	2520
TGATAACCTT	ATTTTGTAG	AGGGGAAATT	AATAGGGTGT	ATTGATGTTG	GAOGAGTGG	2580
AATGCGAGAC	CGATACCAAGG	ATCTTGCCAT	CCTATGGAAC	TGCGCTGGTG	AGTTTCTCC	2640
TTCATTACAG	AAAOGGCTTT	TTCAAAAATA	TGGTATTGAT	AATCTGATA	TGAATAAATT	2700
GCAGTTTCAT	TTGATGCTG	ATGAGTTTTT	CTAATCAGAA	TTGGTTAATT	GGTGTAAACA	2760

CTGGCAGAGC ATTACGCTGA CTTGACGGGA CGGGGGCTTT GTGAAATAAA TOGAACCTTT 2820
 GCTGAGTTGA AGGATCAGAT CAOGCATCTT CCGGACAACG CAGACOGTC CGTGGCAAAG 2880
 CAAAAGTTCA AAATCACCAA CTGGTCCACC TACAACAAAG CTCTCATCAA CGTGGCTCC 2940
 CTCACTTTCT GGCTGGATGA TGGGGGCGATT CAGGCGTGGT ATGAGTCAGC AACACCTCT 3000
 TCAOGAGGCA GACCTCAGCG CTCAAAGATG CAGGGTAAA AGCTAACCGC ATCTTTACCG 3060
 ACAAGGCATC CGGCAGTTCA ACAGATCGGG AAGGGCTGGA TTTGCTGAGG ATGAAGGTGG 3120
 AGGAAGGTGA TGTCACTTCG GTGAAGAAGC TOGACOGTCT TGGCCGCGAC ACGCGCGACA 3180
 TGATCCAATC GATAAAAGAG TTGATGTC AGGGTGTAGC GGTGGTGGTT ATTGACGACG 3240
 CGATCAGTAC CGAOGGTGAT ATGGGGCAAA TGGGGTACAC CATCCCTGTOG GCTGGGCAC 3300
 AGGCTGAACG CGGGAGGATC CAGTTOGAATG TAAACCACTC GTGCACCCAA CTGATCTTC 3360
 GCATCCTTTA CTTCACCAAG CGTTTCTGGG TGAGCAAAAA CAGGAAGGCA AAATGCCGCA 3420
 AAAAAGGGAA TAAGGGGCGAC ACGGAAATGT TGAATACTCA TACTCTCTT TTTCAATAT 3480
 TATTGAAGCA TTATCAGGG TTATGTCCTC ATGAGGGAT ACATAATTGA ATGATTTAG 3540
 AAAAATAAAC AAATAGGGGT TCGGCGACA TTTCGGGAA AAGTGGCACC TGACGTCTAA 3600
 GAAACCATTAA TTATCATGAC ATTAACCTAT AAAAATAGGC GTATCAOGAG GCGCCCTTGT 3660
 CTICAAGTAT CTTCCTTCTT ATTTTGCCTG CGGTAAAGTGG CATAAAAACC ATTCTTCATA 3720
 ATTCAATCCA TTACTATGT TATGTCCTGA GGGGAGTGGAA AATTCCCTAA ATTOGATGAA 3780
 GATTCCTGCT CAATTGTTAT CAGCTATCGG COGACCGAGAA CACCTTGCCTG ATCAGCCAA 3840
 CGTCTCTTCGAA GGCCACTGAC TAGCGATAAC TTTCGGGACA ACGGAACAAAC TCTCAATTGCA 3900
 TGGGATCATT GGGTACTGIG GTTTAGTGG TTGAAAAAAC ACCTGACCGC TATCCCTGAT 3960
 CAGTTTCTTG AAGGTAACACT CATCACCCCC AAGTCTGGCT ATGCAGAAAT CACCTGGCTC 4020
 AACAGCCTGC TCAGGGTCAA CGAGAAATTAA CATTCCGTCGA GGAAAGCTTG GCTTGGAGCC 4080
 TGTGGTGTGG GTCATGGAAT TACCTTCAAC CTCAAGCCAG AATGCGAAAT CACTGGCTTT 4140
 TTGGGTTGIG CTIACCCATC TCTCGGATC ACCTTGGTA AAGGTTCTAA GCTTAGGTGA 4200
 GAAACATCCCT GCGTGAACAT GAGAAAAAAC AGGGTACTCA TACTCTCTC TAAGTGAACGG 4260
 CTGCTACTA ACGCTTCAT ACATCTCGTA GATTCTCTG GCGATTGAAAG GGCTAAATTC 4320
 TTCAAOGCTA ACTTTGAGAA TTTTGTAAAG CAAITGCGGOG TTATAAGCAT TTAATGCAATT 4380
 GATGCCAITA AATAAACAC CAAOGCCIGA CTGGCCCCATC CCCATCTTGT CTGCGACAGA 4440
 TTCCCTGGGAT AAGCCAAGTT CATTCTTCTT TTTTCATAA ATTGCTTTAA GGCGAOGTGC 4500
 GTCTCTCAAGC TGCTCTGTG TTAATGGTTT CTTTTTGTG CTCATAOGTT AAATCTATCA 4560
 COGCAAGGGAA TAAATATCTA ACACOGTGGG TGTGACTAT TTTACCTCTG CGGGTGTAA 4620
 TGGTIGCATG TACTAAGGAG GTGATGGA ACAACGCATA ACCCTGAAAG ATTATGCAAT 4680
 GCGCTTGGGG CAAACCAAGA CAGCTAAAGA TCCCTctagCT AGAATTCTCAGG CTTCTGCGT 4740
 TTGGGATTTA ACGGAAGATG ATTTOGATTT TCTGACGAGT AACAAAGTT GGATTGCTAC 4800
 TGACCCGCTCT CGTGCCTGTC GCTGGGTGTA GGCTTGGGTT TATGGTACGG TGGACTTTGT 4860
 GGGATAACCTC CGCTTCTG CTCCCTGTGA GTTATTGCT GCGTCATTG CTTATTATGT 4920
 TCATCCCGTC AACATTCAA CGGCGTGTCT CATCATGGAA GGCGTGAAT TTACGGAAA 4980
 CATTATTAAT GGOGTGAGC GTCOGGGTTAA AGCGCTGAA TTGTTGGGT TTACCTTGCG 5040
 TGTACGGGCA GGAAACACTG ACGTCTTAC TGAOGCAGAA GAAAACGTC GTCAAAATTC 5100
 ACGTGGGAA GGAGTGTATG AATGTCATAA GGTAAAAAAC GTTCTGGCCTC TOGCCCTGGT 5160
 CGTCCGGCAGC CGTGGGAGG TACTAAAGGC AAGCGTAAAG GCGCTCGTCT TTGGTATGTA 5220
 GGTGGTCAAC AATTCTAATT CGAGGGGCTT CGGCCCTTA CTTGAGGATA AATTATGCT 5280
 AATATTCAAAT CTGGCGCGA GCGTATGCG CATGACCTTT CCCATCTTGG CTCCCTGCT 5340
 GGTCAAGATTG GTGCTCTTAT TACCATTTCA ACTACTCGG TTATGCTTGG CGACTCCCTC 5400
 GAGATGGAGC CGTGGGCGC TCTCGTCTT TCTCCATTGCG GTGCTGGGCT TGCTATTGAC 5460
 TCTACTGTAG ACATTTTAC TTTTATGTC CCTCATCGTC ACGTTTATGG TGAACAGTGG 5520
 ATTAAGTTCA TGAAGGATGG TGTAAATGCC ACTCCCTCTCC CGACTGTTAA CACTACTGGT 5580
 TATATTGACC ATGCGCGTT TCTGGCAAG ATTAACCCCTG ATACCAATAA AATCCCTAAG 5640
 CATTGTTTC AGGGTATTT GAATATCTAT AACAACTATT TTAAAGOGCC GTGGATGCT 5700
 GACCGTACCG AGGCTAACCC TAATGAGAAT TCTCATGTTT GACAGCTTAT CATCGATAAG 5760
 CTTTAATGCC GTAGTTATC ACAGTTAAAT TGCTAACCGCA GTCAAGGACC GTGATGAA 5820
 TCTAACAAATG CGCTCATGTC CATCGTGGC ACGTCACCC TGGATGCTGT AGGCATAGGC 5880
 TTGGTTATGC CGGTACTGCC GGGCGCTCTG OGGGATATCG TCCATTCCGA CAGCGATGCC 5940
 AGTCACTATG GCGTGGCTGCT AGCGCTATAT GCGTGTATGCA AATTCTATG CGCACCGGT 6000
 CTCGGAGCAC TGTCCGACOG CTGGCGCGC CGCCCGATGCC TGCTCGCTC GCTACTTGG 6060
 GCCACTATCG ACTAOGOGAT CATGGCGACC ACACCGTCC TGTGGATCGG GATCAGCAGG 6120
 TGGAAAGAGGG ACTGGATTCC AAAGTCTCA ATGCTGCTTG CTGTTCTGAA ATGGGGGGTC 6180

GTTGAOGAOG ACATGGCTCG ATIGGOGOGA CAAGTTGCTG CGATTCTCAC CAATAAAAAA 6240
 CGCCCOGGGG CAACOGAGCG TTCTGAACAA ATCCAGATGG AGTTCTGAGG TCATTACITGG 6300
 ATCGCOGGAT CTGAATTGCT ATGTTTTAGTG AGTTTGTATCT ATTTATTTTT CAATAAAATAC 6360
 AATTGGTTAT GTGTTTGGG GGCGATCGTG AGGCAAAGAA AACCCGGCGC TGAGGCOGGA 6420
 AGCATAAAAGT GTAAAGCCTG GGGTGOCTAA TGAGTGAGCT AACTCACATT AATTGCGTTG 6480
 CGCTCACTGC CGCCTTCCA GTGGGGAAAC CTGTOGIGCC AGCTGCATTA ATGAATOGGC 6540
 CAACOGOGGG GGAGAGGGG TTGCGTATT GGGGCGCAGG GGGTTTTTC TTTTCACCAAG 6600
 TGAGAOGGC AACAGCTGAT TGCGCTTCAC CGCGTGGCGC TGAGAGAGTT GCAGCAAGCG 6660
 GTCCACGCTG GTTGGCCCGA GCAGGGCGAAA ATCCGTGTTG ATGGTGGTTG ACGGCGGGAT 6720
 ATAACATGAG CTGCTTCTGG TATGCGTGA TCCCCTTACCG GAGATATCGG CACCAACGCG 6780
 CAGCCCOGGAC TGGTAAATGG CGCGCATTGC GCGCAGCGCC ATCTGATGTT TGCGAACCAAG 6840
 CATCGCAGTG GGAAOGATGC CCTCAATTCAAG CATTGCGATG GTTGTGAA AACCGGACAT 6900
 GGCACCTCCAG TGGCTTCCCG GTTCCGCTAT CGGCTGAATT TGATTGCGAG TGAGATAATT 6960
 ATGCCAGCGCA GCGAGAOGCA GAOGOGCGA GACAGAACCTT AATGGGGCGC CTAACACCGC 7020
 GATTGCTGG TGACCCCAATG CGACCAGATG CTCCACGCGCC AGTGGCGTAC CGTCTTCATG 7080
 GGAGAAAATA ATACGTGTTGA TGGGTGTCCTG GTCAAGAGACA TCAAGAAATA ACCCGGAAAC 7140
 ATTAGTGCAG CGAGCTTCCA CAGCAATGGC ATCCGTGCTA TCCAGGGAT AGTTAATGAT 7200
 CAGCCCACTG ACGCGTGTGG CGAGAAAGATT GTGCACCGCC GCTTTACAGG CTGCGACGCC 7260
 GCTTGTCTCT ACCATOGACA CCACCAACGCT GGCACCCAGT TGATGGCGC GAGATTTAAT 7320
 CGCGCGGACA ATTTGCGAOG CGCGCGTGCAG GGCGAGACTG GAGGTGGCAA CGCGAACATCAG 7380
 CAACGACTGT TTGCGCGCCA GTTGTGTCCTG CAOGCGGTTG GGAATGTAAT TCAGCTCGC 7440
 CATCGCGCT TCCACTTTT CGCGCGTTT CGCAGAAACG TGGCTGGCCT GGTCAACCAC 7500
 GCGGAAACG GTCTGATAAG AGACACCGGC ATACGTGCG ACATCGTATA ACGTTACTGG 7560
 TTTCACATTC ACCACCGCTGA ATTGACTCTC TTCCGGCGCT ATCATGCCAT ACCCGGAAAG 7620
 GTTGTGCGCC ATTCGATGGT G 7641

SEQ IDNO:6

ART DER SEQUENZ:Nucleotidsequenz

(pKSEL5)

SEQUENZLÄNGE:3681 Basenpaare

STRANGFORM:Einzelstrang

AAATTGTAAA CGTTAATATT TTGTTAAAAT TCGCGTTAAA TTTTGTGTTAA ATCAGCTCAT 60
 TTTTAACCA ATAGGCGAA ATCGGCAAAA TCCCTTATAA ATCAAAAGAA TAGACOGAGA 120
 TAGGGTTGAG TGTGTTCCA GTTGGAAACA AGAGTCCACT ATTAAAGAAC GTGGACTCA 180
 ACGTCAAAGG GCGAAAAACC GTCTATCAGG GCGATGGGOC ACTACGTGAA CCATCAACCT 240
 AATCAAGTTT TTGGGGTGTG AGGTGCGTA AAGCACTAAA TCGGAACCCCT AAAGGGAGCC 300
 CCGGATTTAG AGCTTGAOGG GGAAAGCGGG CGAACGTTGGC GAGAAAGGAA GGGAAAGAAAG 360
 CGAAAGGAGC GGGCGTAGG GCGCTGGCAA GTGTAGGCGT CACGCTGCGC GIAACCACCA 420
 CACCGCGGCG CTTTAATGCG CGCTACAGG GCGCGTCCCA TTGCGCATTC AGGCTAOGCA 480
 ACTGTTGGGA AGGGGCGATCG GTGCGGGGCT CTGCGTATT ACGCCAGCTG GOGAAGGGGG 540
 GATGTCGTCG AAGGCGATTA AGTTGGGTAA CGCCAGGGTT TTCCCGAGTCA CGACGTTGTA 600
 AAAAGAOGGC CAGTGAATTG TAATACGACT CACTATAGGG CGAATTGGAG CTCCACOGCG 660
 GTGGGGCGCG CTCTAGTATG GTGCACTCTC AGTACAATCT GCTCTGATGC OGCATAGTTA 720
 AGCCAGTATA TACACTCGC TATGCTACG TGACTGGGTC ATGGCTGCGC CGCGACACCC 780
 GCCAACACCC GCTGAAOGCGC CCTGACGGGC TTGTCGTC CCGGCATCG CTTACAGACA 840
 AGCTGTGACC GTCTCGGGA GCTGCATGTG TCAAGAGGTT TCACCGTCAT CACCGAAACG 900
 CGCGAGGCAG TAAGGTOGGA TGCTTGTGA GCAATTGTC CCTTAAGTAA GCAATTGCTG 960
 TAAAGTOGTC ACTGIGCGGA TCACCGCTTC CAGTAGOGAC AGAAGCAATT GATGGTAAA 1020
 TTGAGAGAGA AAGATOGOGA GGAAGATCAA TACATAAAGA GTTGAACITC TTGTTGTC 1080
 TOGACATGGG TAATCCCTCAT GTTGAATGG CCTTAGAGGA TCCGGCCAAG CTGCGATGCC 1140
 TGCAGGTOGA CTCTAGAGGA TCCCGAOGC TOGAOGCCAT TAATAATGTT TTGCGTAAAT 1200
 TCAAGOGCCTT CCATGATGAG ACAGGCGTT TGAATGTGA CGGGATGAAAC ATAATAAGCA 1260
 ATGACGGCAG CAATAAAACTC AACAGGAGCA GGAAAGCGAG GGTATCCCAC AAAGTCCAGC 1320
 GTACCATAAA CGCAAGCTC AACGGCAGOGA CGAGCACGAG AGGGTCAGT AGCAATCCAA 1380
 ACTTGTGAC TOGTGAGAAA ATGAAATCA TCTTGGTTA AATCCAAAAC GCCAGAAGCC 1440
 TGAATGAGAA TTGACCTCG AGGGGGGCC CGGTACCCAG CTTTGTGTC CTTTGTGAG 1500
 GGTAAATTC GAGCTGGCG TAATCATGGT CATACTGTT TCCTGTGTA AATGTTATC 1560
 CGCTCACAAT TCCACACAAC ATAGGAGCG GAAGCATAAA GTGTAAGCC TGGGGTGCCT 1620
 AATGAGTGTG GTCACATACA TTAATTGCGT TGOGCTCACT GCGCGCTTC CAGTCGGGAA 1680
 ACCCTGTOGIG CGAGCTGCAT TAATGAATCG GCGAACGCGC GGGGAGAGGC GGTGTTGOGTA 1740
 TTGGGCGCTC TTGCGCTTCC TOGCTCACTG ACTGCTGCG CTOGGTGTGTT OGGCTGOGGC 1800
 GAGGGTATC AGCTCACTCA AAGGGGTTAA TACGGTTATC CACAGAATCA GGGGATAACG 1860
 CAGGAAAGAA CATGTGAGCA AAAGGCGAGC AAAAGGCCAG GAACCGTAAA AAGGCACCGT 1920
 TGCCTGGGTT TTCCATAGG CTOGGCCCCC CTGACGAGCA TCACAAAAT CGACGCTCAA 1980
 GTCTAGAGGTG GCGAAACCG ACAGGACTAT AAAGATACCA GGOGTCCCCC CCTGGAAAGCT 2040
 CCTCTGGCG CTCTCTGTT CGACCGCTGC CGCTTACOGG ATACCTGTC GCGTTCTCC 2100
 CTGCGGAAG CGTGGCGCTT CTCAATGCT CACGCTGTAG GTATCTCAGT TOGGTGTAGG 2160
 TGGTTOGTC CAACTGGGC TGTGTCGCAOG AACCCCCCGT TCAGCCCGAC CGCTGOGCT 2220
 TATCGGGTAA CTATGCTT GAGTCCAACC CGGTAAGACA CGACTTATCG CCACTGGCAG 2280
 CAGCCACTGG TAACAGGATT AGCAGAGOGA GGTATGTAGG CGGTGCTACA GAGTTCITGA 2340
 AGTGGGCGGC TAACTACGGC TACACTAGAA GGACAGTATT TGGTATCTGC GCTCTGCTGA 2400
 AGCCAGTAC CTGGAAAAA AGAGTGGTA GCTCTTGATC OGGCAAACAA ACCACOGCTG 2460
 GTAGCGGTGG TTTTTTGTG TGCAAGCAGC AGATTAOGCG CAGAAAAAAA GGATCTCAAG 2520
 AAGATCTT GATCTTCT ACGGGGTCTG ACGCTCAGTG GAACGAAAAC TCACGTTAAG 2580
 GGATTTGGT CATGAGATTA TCAAAAAGGA TCTTCACCTA GATCCCTTAA AATAAAAAAT 2640
 GAAGTTTAA ATCAATCTAA AGTATATATG AGTAAACTTG GTCTGACAGT TACCAATGCT 2700

TAATCAGTGA GGCACCTATC TCAGOGATCT GTCTTATTCTG TTCAATCCATA GTTGCCTGAC 2760
TGGCCCGTGT GTAGATAACT ACGATAACGGG AGGGCTTACCC ATCTGGCCCC AGTGCCTGCAA 2820
TGATAACCGCG AGACCCACGC TCACOGGCCTC CAGATTTATC AGCAATAAAC CAGCCAGCCG 2880
GAAGGGCGGA GOGCAGAAGT GGTCCTGCAA CTTTATCOGC CTCCATOCAG TCTATTAAAT 2940
GTTCGGGGGA AGCTAGAGTA AGTAGTTCGC CAGTTAATAG TTTGOGCAAC GTTGTGCCA 3000
TTGCTACAGG CATCGGGTG TCAOGCTGT CGTTGGTAT GGCTTCATTC AGCTCGGGT 3060
CCCAACGATC AAGGCGAGTT ACATGATCC CCAATGTTGIG AAAAAAAAGCG GTTACGCTCT 3120
TOGGTCTCTC GATCGTTGTC AGAAGTAAGT TGGCGCGAGT GTTATCACTC ATGCTTATGG 3180
CAGCACTGCA TAATTCTCTT ACTGTCATGC CATCGTAAAG ATGCTTTCT GTGACTGGTG 3240
AGTACTCAAC CAAGTCATTC TGAGAATAGT GTATGOGGCG ACCGAGTTGC TCTTGGCCGG 3300
CGTCATAACG GGATAATACC GOGCCACATA GCAGAACTTT AAAAGTGCTC ATCAATTGGAA 3360
AACTTCTTC GGGGCGAAAA CTCTCAAGGA TCTTACOGCT GTTGAGATCC AGTTGATGT 3420
AACCACCTCG TGCACCCAAC TGATCTTCAG CATCTTTAC TTTCACCAGC GTTTCIGGGT 3480
GAGCAAAAC AGGAAGGCAA AATGCGCAA AAAAGGGAAT AAGGGCGACA CGAAATGTT 3540
GAATACTCAT ACTCTTCTT TTCAATATT ATTGAAGCAT TTATCAGGGT TATTGCTCA 3600
TGAGCGGATA CATATTGAA TGTATTAGA AAAATAAACAA AATAGGGGT COGCGCACAT 3660
TTCCCGAAAA AGTGGCACCT G 3681

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Trägergebundenes rekombinantes Protein erhältlich durch Expression eines Fusionsprotein-Gens in gramnegativen Bakterien, welches für mindestens ein hydrophobe, nicht lytisch wirkende membranintegrierende Proteindomäne sowie für das rekombinante Protein kodiert und eines Gens, das für ein lytisch wirkendes Membranprotein aus Bakteriophagen, für ein lytisch wirkendes Toxinreleasegen oder für lytisch wirkende Teilsequenzen davon kodiert, und Gewinnung des trägergebundenen rekombinanten Proteins aus der Kulturbrühe.
2. Trägergebundenes rekombinantes Protein nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, daß die Proteindomäne eine alphahelicale Struktur besitzt und aus 14 bis 20 Aminosäuren besteht, die N- und C-terminal von je 2 bis 30 beliebigen Aminosäuren flankiert sein kann.
3. Trägergebundenes rekombinantes Protein nach den Ansprüchen 1 oder 2 dadurch gekennzeichnet, daß das Fusionsprotein mindestens eine weitere Proteindomäne enthält, die aus 10 bis 16 Aminosäuren besteht und eine β -Faltblatt-Sekundärstruktur besitzt.
4. Trägergebundenes rekombinantes Protein nach den Ansprüchen 1 bis 3 dadurch gekennzeichnet, daß die Proteindomäne, die Aminosäuren 1 bis 54 aus dem Protein E des Phagen PhiX174, die Aminosäuren 21 bis 75 aus dem Protein L des Phagen MS2 und/oder eine Aminosäuresequenz, die aus diesen Sequenzen durch Aminosäureaustausch erhältlich ist und eine analoge Protein-Sekundärstruktur besitzt, enthält.

5. Trägergebundenes rekombinantes Protein nach den Ansprüchen 1 bis 4 dadurch gekennzeichnet, daß die Proteindomänen und das rekombinante Protein durch eine hydrophile Aminosäuresequenz mit 2 bis 100 Aminosäuren und ungeordneter Sekundärstruktur verbunden sind.
6. Trägergebundenes rekombinantes Protein nach den Ansprüchen 1 bis 5 dadurch gekennzeichnet, daß das rekombinante Protein eine antigene Struktur aufweist.
7. Trägergebundenes rekombinantes Protein nach den Ansprüchen 1 bis 6 dadurch gekennzeichnet, daß an das rekombinante Protein ein nicht kovalent bindender Bindungspartner für dieses Protein, an dem gegebenenfalls noch weitere Substanzen kovalent oder nicht kovalent gebunden sind, gebunden ist.
8. Trägergebundenes Protein nach Anspruch 7 dadurch gekennzeichnet, daß das rekombinante Protein Streptavidin oder Avidin ist.
9. Trägergebundenes Protein nach den Ansprüchen 7 und 8 dadurch gekennzeichnet, daß der nicht kovalente Bindungspartner ein biotinyliertes Antigen ist.
10. Rekombinante DNA, die eine erste DNA-Sequenz (DNA-Targetsequenz), welche für mindestens eine hydrophobe, nicht lytisch wirkende membranintegrierende Proteindomäne codiert, eine zweite DNA-Sequenz (DNA-Proteinsequenz), die für ein rekombinantes Protein kodiert, sowie eine unter

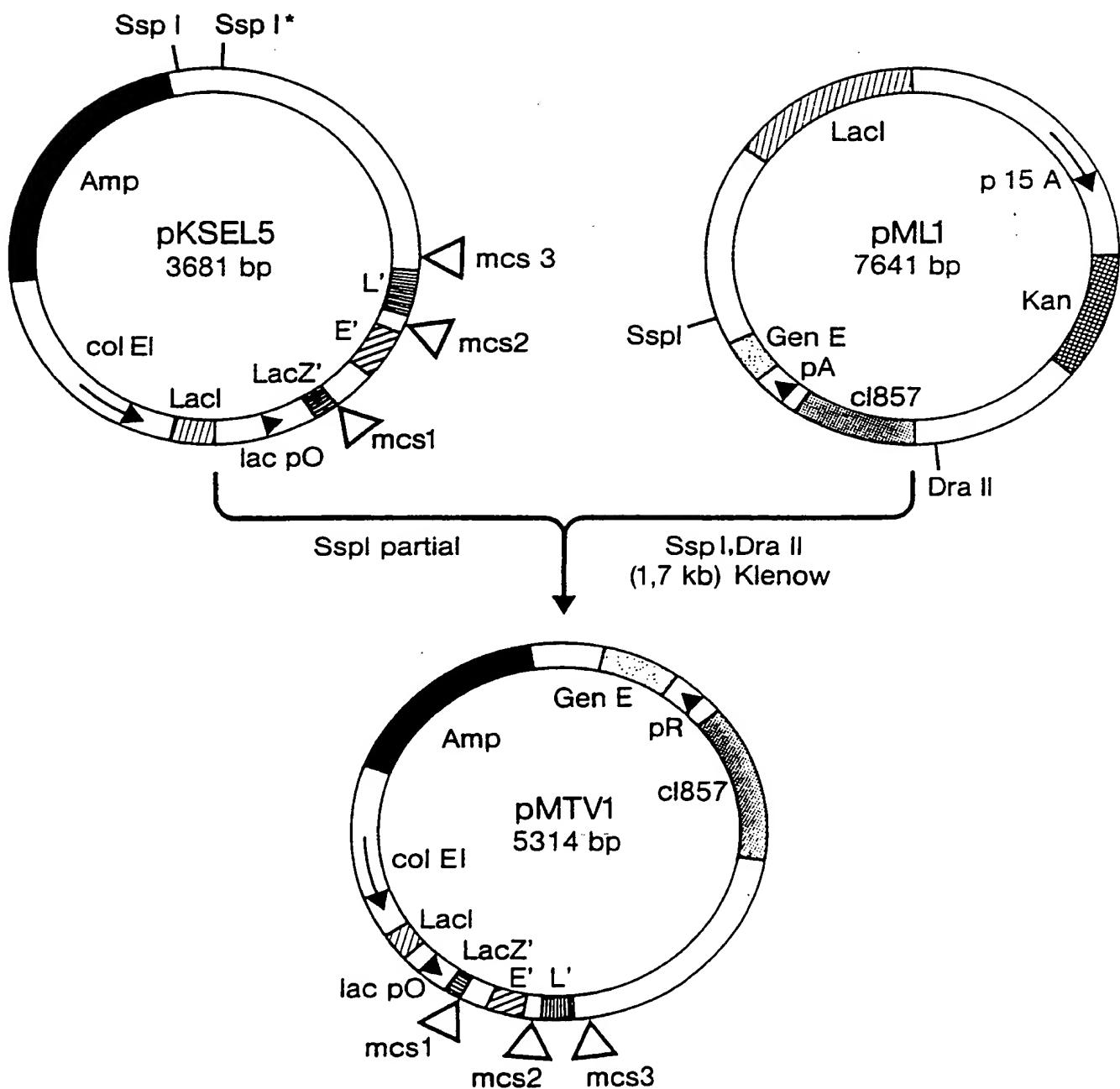
davon getrennter Kontrolle stehenden DNA-Sequenz (DNA-Lysegen), die für ein lytisch wirkendes Membranprotein aus Bacteriophagen oder ein lytisch wirkendes Toxin-release-Gen oder für deren lytisch wirkenden Teile kodiert, enthält.

11. Verfahren zur Herstellung einesträgergebundenen rekombinanten Proteins, dadurch gekennzeichnet, daß in gramnegativen Bakterien ein Fusionsprotein, welches mindestens eine hydrophobe nicht lytisch wirkende membranintegrierende Proteindomäne sowie ein rekombinantes Protein enthält und ein lytisch wirkendes Membranprotein aus Bakteriophagen oder eines lytisch wirkenden Toxinrelease Gens oder lytisch wirkender Teilsequenzen davon exprimiert werden und dasträgergebundene rekombinante Protein aus der Kulturbüre gewonnen wird.
12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens ein weiteres Gen eines rekombinanten Proteins exprimiert wird.
13. Verfahren nach den Ansprüchen 11 oder 12 dadurch gekennzeichnet, daß bei der Kultivierung die Aktivität des lytischen Membranproteins inhibiert oder die Expression des lytisch wirkenden Membranproteins oder Toxingens reprimiert wird und zu einem gewünschten Zeitpunkt die Inhibition oder Repression aufgehoben wird.
14. Verfahren nach den Ansprüchen 11 - 13 dadurch gekennzeichnet, daß dasträgergebundene Protein mit einem gegebenenfalls derivatisierten Bindungspartner für dasträgergebundene Protein inkubiert und das entstandeneträgergebundene Konjugat isoliert wird.

15. Verfahren zur Herstellung von Antikörpern dadurch gekennzeichnet, daß ein Säugetier mit einem trägergebundenen Protein nach den Ansprüchen 1 bis 9 immunisiert wird und die Antikörper aus dem Serum oder der Milz gewonnen werden.
16. Verfahren zur Herstellung von Antikörpern nach Anspruch 15 dadurch gekennzeichnet, daß B-Lymphozyten der immunisierten Tiere in Gegenwart von transformierenden Agenzien, mit einer geeigneten Zelllinie fusioniert werden, die gewünschte Antikörper produzierende Zelllinie kloniert und kultiviert wird und aus den Zellen oder dem Kulturüberstand die Antikörper gewonnen werden.
17. Verwendung der trägergebundenen Proteine nach den Ansprüchen 1 - 9 zur Herstellung von Vakzinen.
18. Vakzin, erhältlich nach den Ansprüchen 1 - 9.

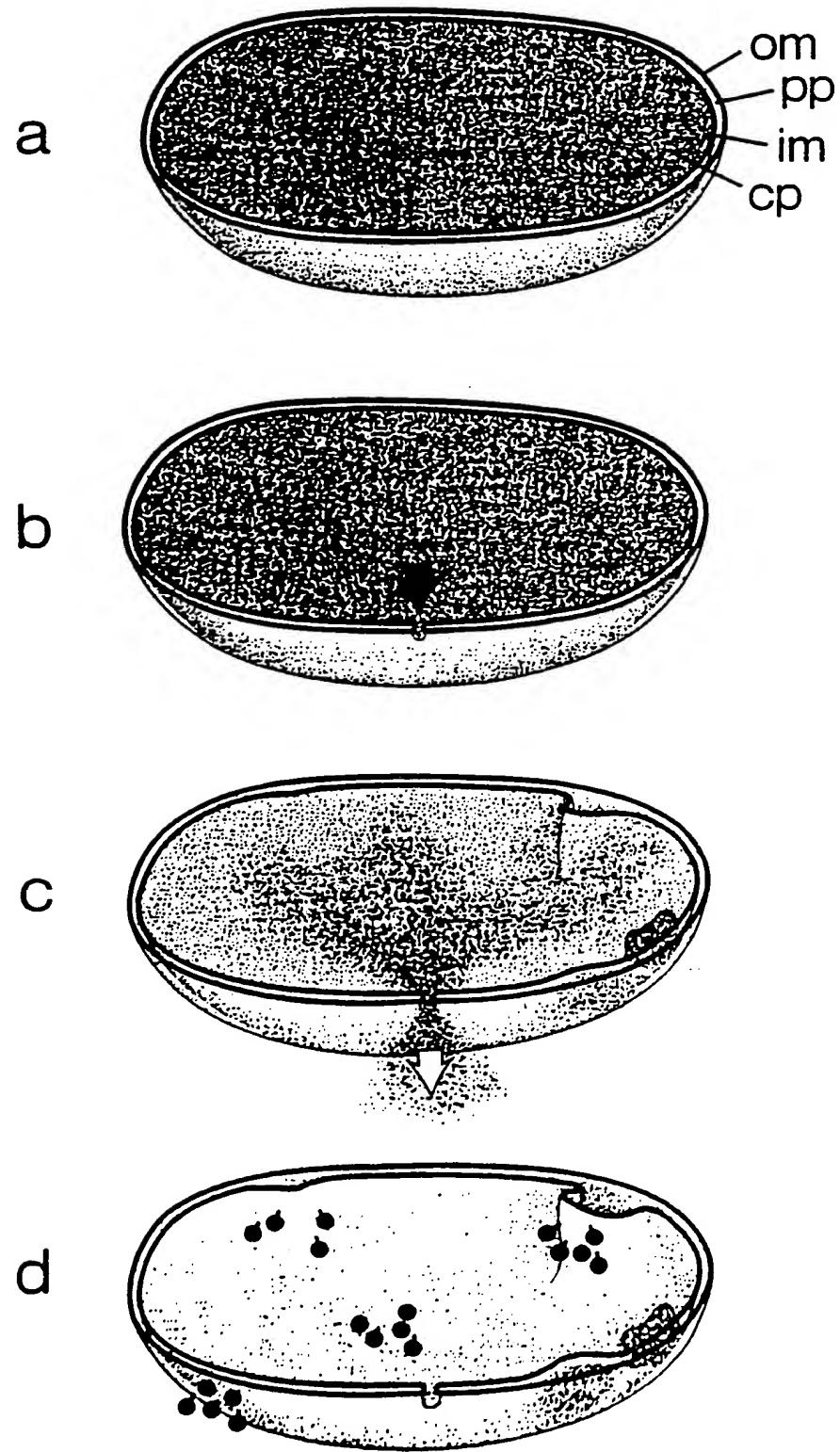
1/2

Fig. 1



2/2

Fig. 2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP 91/00308

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) ⁶

According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC

Int. Cl. ⁵ C 12 N 15/62, A 61 K 39/00

II. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched ⁷

Classification System	Classification Symbols
Int. Cl. ⁵	C 12 N, A 61 K

Documentation Searched other than Minimum Documentation
to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT⁹

Category ¹⁰	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
X	EP, A, 0291021 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 17 November 1988 see the whole document (cited in the application)	1,4,10,11, 13
A	WO, A, 8706590 (BIOENTERPRISES PTY.LTD) 5 November 1987 see claims 1-3,17-21,37,38	
P, X	Res. Microbiol., vol. 141, No. 7-8, 1990, Institut Pasteur/Elsevier, (Paris, FR), M. Szostak et al.: "Recombinant bacterial ghosts as vaccines", pages 1005-1007	1-6,10-13, 15-18

- Special categories of cited documents: ¹⁰
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "G" document member of the same patent family

IV. CERTIFICATION

Date of the Actual Completion of the International Search

13 May 1991 (13.05.91)

Date of Mailing of this International Search Report

28 June 1991 (28.06.91)

International Searching Authority

EUROPEAN PATENT OFFICE

Signature of Authorized Officer

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.

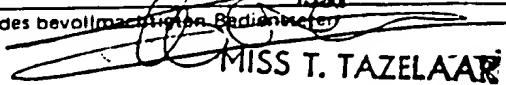
EP 9100308
SA 44507

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 25/06/91. The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP-A- 0291021	17-11-88	DE-A-	3715840	01-12-88
		JP-A-	63287489	24-11-88
WO-A- 8706590	05-11-87	EP-A-	0267204	18-05-88
		JP-T-	1500117	19-01-89
		AU-A-	7351087	24-11-87
		ZA-A-	8702795	07-10-87

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 91/00308

I. KLASSEFAKTION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben) ⁶ Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
Int.CI ⁵ C 12 N 15/62, A 61 K 39/00		
II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE		
Recherchierter Mindestprüfstoff ⁷		
Klassifikationssystem Klassifikationssymbole		
Int.CI. ⁵	C 12 N, A 61 K	
Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen ⁸		
III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN⁹		
Art*	Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²	Betr. Anspruch Nr. ¹³
X	EP, A, 0291021 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 17. November 1988 siehe das ganze Dokument in der Anmeldung erwähnt --	1, 4, 10, 11, 13
A	WO, A, 8706590 (BIOENTERPRISES PTY. LTD) 5. November 1987 siehe Ansprüche 1-3, 17-21, 37, 38 --	
P, X	Res. Microbiol., Band 141, Nr. 7-8, 1990, Institut Pasteur/Elsevier, (Paris, FR), M. Szostak et al.: "Recombinant bacterial ghosts as vaccines", Seiten 1005-1007 -----	1-6, 10-13, 15-18
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen ¹⁰ : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmelddatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmelddatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist		
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmelddatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
IV. BESCHEINIGUNG		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 13. Mai 1991		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts 28 JUN 1991
Internationale Recherchenbehörde Europäisches Patentamt		Unterschrift des bevoilmaerten Beamten  MISS T. TAZELAAR

**ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT
ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 9100308
SA 44507

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.

Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am 25/06/91.
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
EP-A- 0291021	17-11-88	DE-A-	3715840	01-12-88
		JP-A-	63287489	24-11-88
WO-A- 8706590	05-11-87	EP-A-	0267204	18-05-88
		JP-T-	1500117	19-01-89
		AU-A-	7351087	24-11-87
		ZA-A-	8702795	07-10-87